

## **2. Intrazellulärer Transport und Stabilität aufgenommener viraler Partikel**

Bis heute ist unbekannt wie Hepadnaviren die lange Distanz zwischen Zelloberfläche und Nukleus überwinden. Für andere Viren wurde gezeigt, dass sie für den Transport zu ihrem jeweiligen Replikationsort das Zytoskelett ausnutzen [159, 160].

Die Aufnahme der Hepadnaviren in ihre Wirtszellen erfolgt, wie oben gezeigt, im Vergleich zu Viren, die durch klassische Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen werden, relativ langsam. Innerhalb von 3 h sind jedoch alle an der Zelloberfläche gebundenen Viren in die Zelle eingedrungen. Dann folgt jedoch ein sehr langer Zeitraum von ca. 17 h bevor die virale cccDNA im Zellkern einer infizierten Zelle nachgewiesen werden kann [38, 161]. Es verbleibt demnach eine lange Zeitspanne für den intrazellulären Transport zum Zellkern und die Umwandlung der rcDNA in cccDNA. Daher stellt sich die Frage, ob DHBV in der Lage ist, die zellulären Transportsysteme zu nutzen, die sehr effizient sind und Kargo innerhalb weniger Stunden transportieren können.

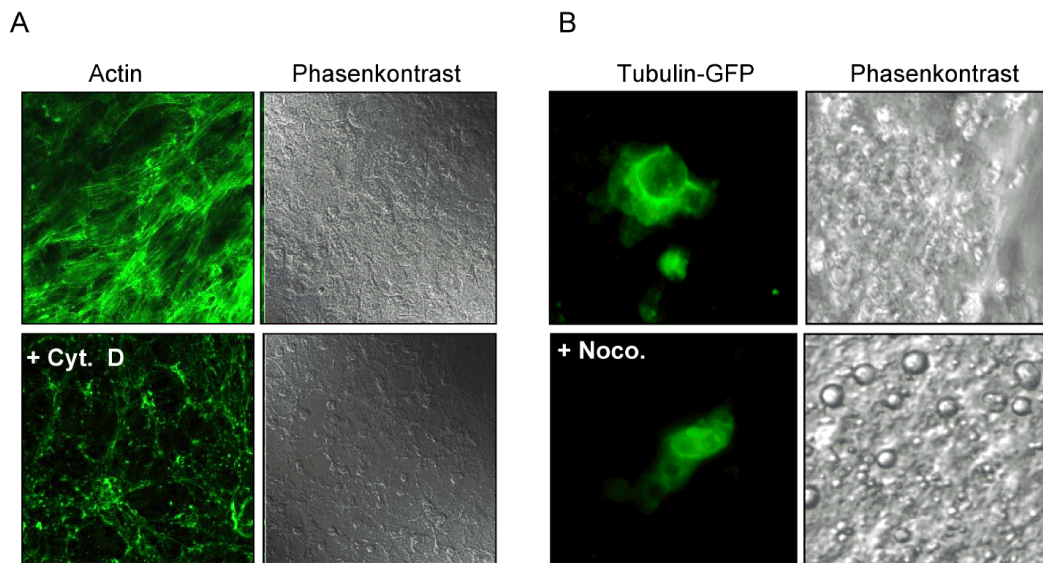
### **2.1 Ergebnisse**

#### 2.1.1 Zerstörung des Zytoskeletts verstärkt die virale Bindung an Hepatozyten

Um untersuchen zu können, ob das Zytoskelett während der viralen Internalisierung oder des Transports in PDHs genutzt wird, wurde zuerst der Effekt von drei chemischen Substanzen auf das Zytoskelett und die DHBV-Bindung untersucht: Cytochalasin D depolymerisiert Aktin, Nocodazol die Tubulinfilamente und Paclitaxel verhindert den dynamischen Auf- und Abbau der Mikrotubuli (MTs) durch Stabilisierung.

Behandlung der PDHs mit Cytochalasin D und Nocodazol für 1 h depolymerisierte die Aktin- bzw. Tubulinfilamente komplett wie aus den drastischen Veränderungen des Zytoskeletts der PDHs zu erkennen war, die durch Fluoreszenzmikroskopie von ektopisch exprimiertem Tubulin-GFP (**Abb.**

**3.2.1 B)** oder TRITC-Phalloidin-gefärbtem Aktin (**Abb. 3.2.1 A**) sichtbar gemacht wurden.

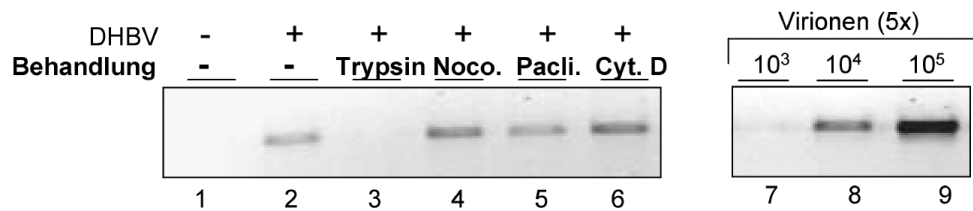


**Abb. 3.2.1 Visualisierung des hepatozellulären Zytoskeletts und seine Zerstörung in PDHs.**

(A) PDHs wurden für 1 h mit Cytochalasin D (Cyt. D) behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Aktinfasern mit TRITC-Phalloidin gefärbt. (B) PDHs, die ektopisch GFP-Tubulin exprimierten, wurden für 1 h mit Nocodazol (Noco.) behandelt und anschließend analysiert. Gezeigt ist das Fluoreszenzbild mit korrespondierendem Phasenkontrast von unbehandelten Kontrollen und behandelten Kulturen.

Im Gegensatz zu den geordneten Aktinfilamenten in unbehandelten Zellen zeigte sich in Cytochalasin D-behandelten Zellen ein granuläres Muster; dies deutete auf eine effiziente Fragmentierung der Aktinfilamente hin (**Abb. 3.2.1 A**, unterer Teil). Tubulin-GFP-transfizierte PDHs zeigten eine starke Fluoreszenz um den Nukleus von dem feine MT-Bündel ausstrahlten (**Abb. 3.2.1 B**, oberer Teil). Dieses Muster unterschied sich aus bisher unbekannten Gründen von dem verschiedener Hepatomzelllinien. Nach der Nocodazol-Behandlung kollabierte das filamentöse Tubulingerüst und wurde vorwiegend diffus (**Abb. 3.2.1 B**, unterer Teil). Sorgfältige Untersuchung der Zellen durch Lichtmikroskopie zeigte keine starken morphologischen Veränderungen der behandelten PDHs (**Abb. 3.2.1**, Phasenkontrast).

Nachdem gezeigt wurde, dass das Zytoskelett durch die Behandlung mit chemischen Substanzen erfolgreich zerstört werden konnte, wurden die Effekte dieser Substanzen auf die virale Bindung untersucht. Die Kulturen wurden mit Cytochalasin D, Nocodazol oder Paclitaxel 1 h vorbehandelt und dann für 2 h bei 4°C mit DHBV inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, lysiert und die gebundene DHBV-DNA-Menge durch PCR untersucht.



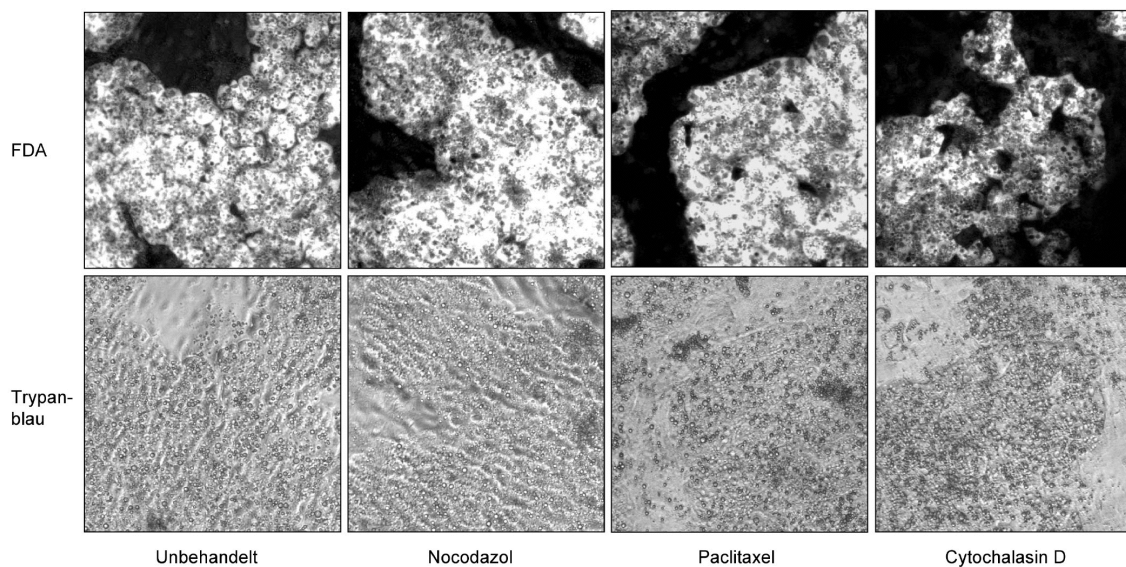
**Abb. 3.2.2 Effekt der Zytoskelett-inhibierenden Substanzen auf die virale Bindung.**

PDHs wurden für 1 h mit Nocodazol (Noco.), Paclitaxel (Pacli.) oder Cytochalasin D (Cyt. D) vorbehandelt. Dann wurden die Kulturen für 2 h bei 4°C mit DHBV inkubiert und anschließend für die DHBV-DNA-spezifische PCR geerntet. In einem Ansatz wurde das gebundene Virus vor der Ernte durch Trypsin von der Zelloberfläche entfernt (Spur 3).

Zerstörung des Aktin- und Tubulinskeletts durch Cytochalasin D und Nocodazol vor der DHBV-Bindung hatte keinen negativen Effekt auf die virale Bindung, sondern verstärkte sie im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Abb. 3.2.2**, Spuren 2, 4 und 6). Paclitaxel, das die MTs stabilisiert, hatte keinen Einfluss auf die virale Bindung (**Abb. 3.2.2**, Spuren 2 und 5).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass ein intaktes Zytoskelett für die virale Bindung an Hepatozyten nicht benötigt wird. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf kryptische Virusbindungsstellen, die nur nach einer Behandlung mit Zytoskelett-zerstörenden, aber nicht –stabilisierenden Substanzen zugänglich wurden.

Um ausschließen zu können, dass die experimentellen Daten aus unspezifischen, toxischen Effekten der Substanzen resultierten, wurden chronisch DHBV-infizierte PDHs mit den Substanzen für 24 h behandelt. Anschließend wurden eine Trypanblau-Färbung und eine FDA-Färbung (Fluoreszein-Diazetat) durchgeführt (**Abb. 3.2.3**). Diese Vitalitätstests ergaben keine sichtbare Zytotoxizität.

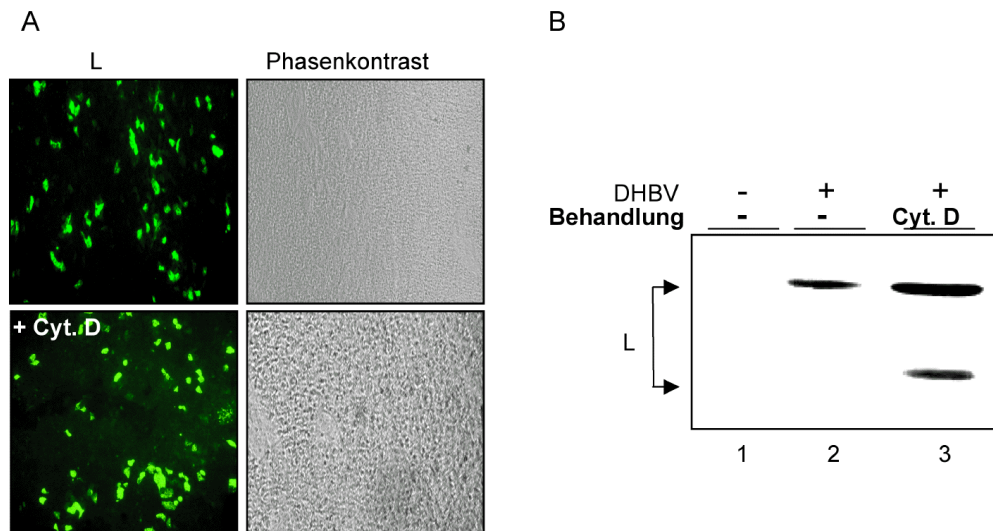


**Abb. 3.2.3 Behandlung von PDHs mit Zytoskelett-inhibierenden Substanzen hat keine zytotoxischen Effekte.**

Chronisch-infizierte PDHs wurden 24 h mit den angegebenen Substanzen behandelt. Anschließend wurde ein Zytotoxizitätstest mittels FDA- und Trypanblau-Färbung durchgeführt. FDA färbt dabei nur die Hepatozyten in der primären Leberzellkultur.

### 2.1.2 Das Aktinskelett ist für eine produktive, virale Infektion entbehrlich

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die virale Aufnahme oder der intrazelluläre Transport ein intaktes Aktinskelett benötigt. Um diese Frage zu beantworten, wurden PDHs für 2 h bei 37°C mit Cytochalasin D vorbehandelt und anschließend mit DHBV inokuliert, ohne die Substanz zu entfernen. Nach 14 h Inkubation wurde Cytochalasin D und ungebundenes Virus durch Waschen der Zellen mit PBS entfernt. Zusätzlich wurde Oberflächen-gebundenes, aber noch nicht internalisiertes Virus durch einen pH-Schock inaktiviert. Dann wurde Medium ohne Cytochalasin D zugegeben und die Zellen für weitere drei Tage inkubiert. Die Kulturen wurden geerntet und die Infektionseffizienz durch Analyse der Zahl der infizierten Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung und Immunblot bestimmt.



**Abb. 3.2.4 Das Aktinskelett ist für die Etablierung einer produktiven DHBV-Infektion entbehrlich.**

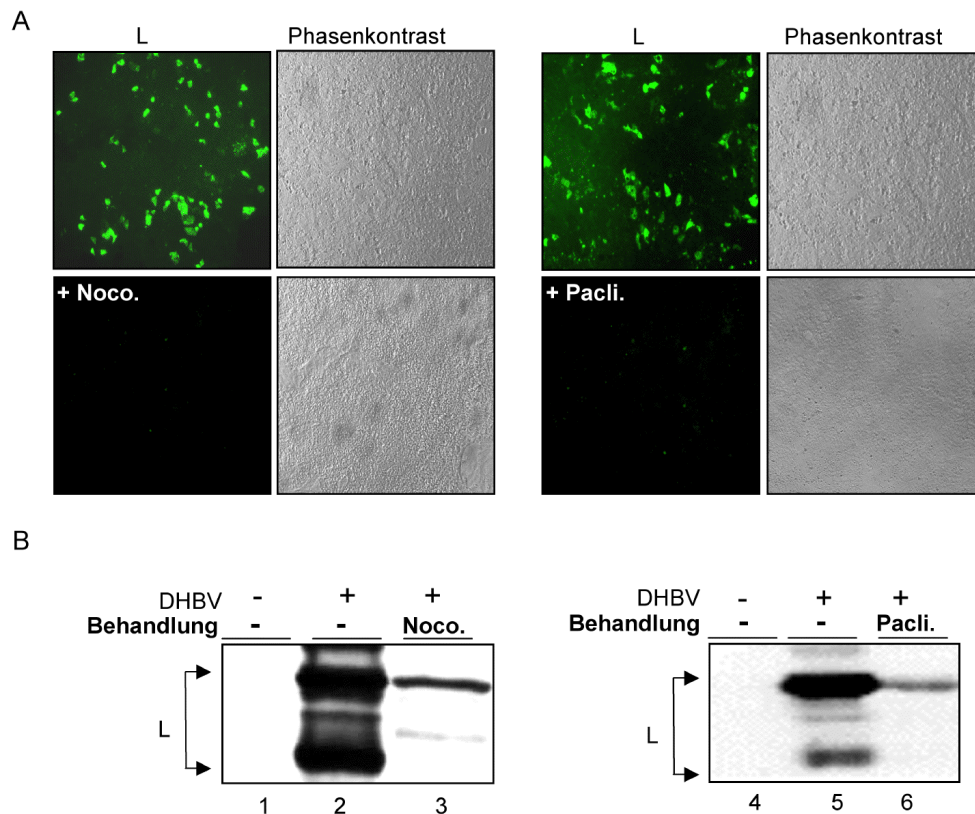
Das Aktinskelett wurde 2 h mit Cytochalasin D inaktiviert, dann wurden die Kulturen inokuliert und für weiter 16 h kultiviert. Nach einem pH-Schock und Waschen wurden die Zellen drei Tage inkubiert. Dann wurde eine Immunfluoreszenz (A)- und Immunblotanalyse (B) mit dem L-Protein-Antikörper KpnI durchgeführt. Fluoreszenzbild und passender Phasenkontrast desselben Feldes sind gezeigt, unter B der korrespondierende Immunblot.

Behandlung mit Cytochalasin D hatte keinen negativen Effekt auf die virale Infektion, sondern erhöhte sogar leicht die Zahl der infizierten Zellen verglichen mit der Kontrolle (**Abb. 3.2.4 A**). Auch die Immunblot-Analyse der Zelllysate ergab erhöhte L-Mengen in den behandelten Zellen (**Abb. 3.2.4 B**) und bestätigte so die Immunfluoreszenzdaten.

Dieses Ergebnis ist konsistent mit der erhöhten viralen Bindung an die Cytochalasin D-behandelten Zellen, die oben gezeigt wurde (**Abb. 3.2.2**), und wies darauf hin, dass der Aktinkortex und die Filamente für die Infektion nicht essentiell sind, sondern eher ein Hindernis darstellen. Zusammen zeigten die Daten, dass strikt Aktin-abhängige Prozesse nicht für die virale Aufnahme oder den intrazellulären Transport benötigt werden, um eine produktive DHBV-Infektion in primären Hepatozytenkulturen zu etablieren.

### 2.1.3 Mikrotubuli sind für eine produktive virale Infektion in Hepatozyten essentiell

Da Aktinfilamente für eine DHBV-Infektion nicht benötigt werden, wurde die Abhängigkeit der viralen Infektion von MTs untersucht. Zur Inaktivierung der MTs wurden die Zellen für 2 h mit Nocodazol oder Paclitaxel vorbehandelt. Dann wurde DHBV zugegeben und die Kulturen für weitere 14 h mit den Substanzen und Virus bei 37°C inkubiert. Nicht-gebundenes Virus und die Inhibitoren wurden dann gewaschen und ein pH-Schock durchgeführt. Nach weiteren drei Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet und durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung sowie Immunblotting analysiert.



**Abb. 3.2.5** Dynamische, intakte Mikrotubuli sind für die Etablierung einer DHBV-Infektion unerlässlich.

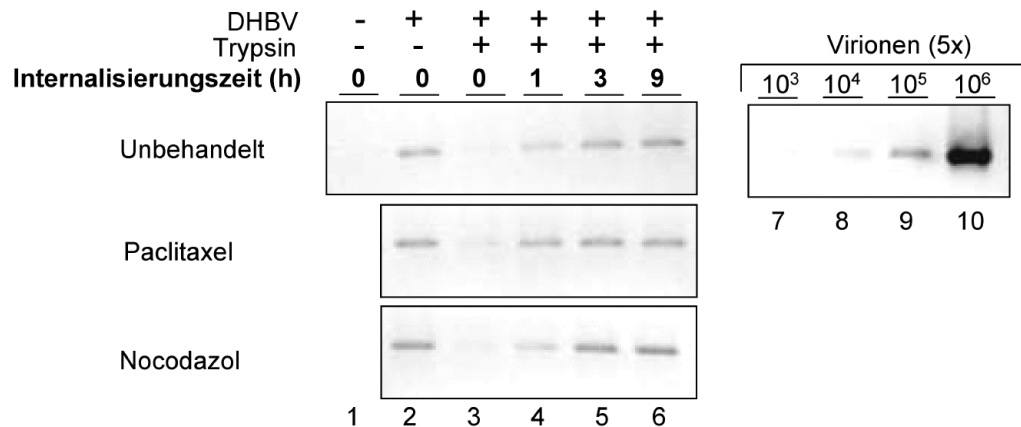
MTs wurden entweder durch 2 h Behandlung mit Nocodazol (Noco.) depolymerisiert oder durch Paclitaxel (Pacli.) inaktiviert. Dann wurden die Kulturen inokuliert und für weitere 14 h inkubiert, bevor ein pH-Schock und ein Waschschrift durchgeführt wurden. Nach drei Tagen wurden die Zellen

entweder für den L-Immunblot (B) geerntet oder für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung (A) fixiert.

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte nur sehr wenige infizierte Hepatozyten in den behandelten Kulturen. In der Kontrolle waren dagegen ungefähr  $10^4$  infizierte Zellen vorhanden (**Abb. 3.2.5 A**). Dies belegte, dass die Infektion nahezu komplett durch beide Substanzen inhibiert wurde. Die drastisch reduzierten L-Protein-Mengen, die durch den Immunblot in behandelten Kulturen nachgewiesen wurden, unterstützten dieses Ergebnis (**Abb. 3.2.5 B**). Die Daten zeigten, dass die Etablierung einer produktiven Infektion ohne funktionelle MTs während der ersten 14 h des viralen Lebenszyklus extrem ineffizient ist. Darüber hinaus erwiesen die Daten, dass DHBV sowohl intakte (inhibierbar durch Nocodazol) als auch dynamische (inhibierbar durch Paclitaxel) MTs benötigt.

#### 2.1.4 Mikrotubuli werden nicht für die Aufnahme von DHBV in PDHs benötigt

Die Inaktivierung der MTs führte zu einer stark reduzierten Zahl der infizierten Zellen. Dieser Effekt könnte auf eine reduzierte virale Bindung oder Internalisierung zurückzuführen sein. Da in Abschnitt 2.1.1 gezeigt wurde, dass die virale Bindung an Hepatozyten nicht von MTs abhängig war, wurde als nächstes untersucht, ob die Inhibition der DHBV-Infektion durch Nocodazol und Paclitaxel auf einem Block der Virusinternalisierung basierte. Wenn dies der Fall sein sollte, sollten keine oder nur sehr kleine Mengen viraler Partikel in die behandelten Zellen aufgenommen werden. Diese Differenz sollte im Protease-Schutzassay detektierbar sein und wurde deshalb experimentell untersucht. Nach der Vorbehandlung mit den Substanzen und Inkubation der Zellen mit DHBV für 2 h bei 4°C wurden die Kulturen gewaschen, durch Lyse geerntet und die Menge Zell-assoziiierter DNA durch PCR bestimmt. Außerdem wurden Parallelkulturen auf 37°C erwärmt, um die virale Internalisierung zu erlauben, und zu verschiedenen Zeitpunkten danach geerntet.



**Abb. 3.2.6 Mikrotubuli werden für einen Schritt nach der viralen Bindung und Internalisierung benötigt.**

Primäre Entenhepatozyten wurden 1 h mit Nocodazol oder Paclitaxel vorbehandelt. Anschließend wurden die Kulturen für 2 h bei 4°C inokuliert. Dann wurden die Zellen entweder direkt geerntet oder für verschiedene Zeitspannen auf 37°C erwärmt und nach Trypsinverdau geerntet. Die Zell-assoziierte virale DNA wurde durch PCR nachgewiesen.

Trypsinbehandlung der Zellen vor der Lyse reduzierte die Menge an nachweisbarer Virus-DNA auf ungefähr 10 % der Ausgangsmenge (**Abb. 3.2.6**, Spuren 1 bis 3). Um nun zu bestimmen wie viel des gebundenen Virus in behandelte oder unbehandelte Zellen unter den verwendeten Bedingungen eindrang, wurden Parallelkulturen auf 37°C transferiert und für weitere 1 h, 3 h und 9 h in neuem Medium mit oder ohne Nocodazol bzw. Paclitaxel inkubiert. Oberflächen-gebundenes Virus wurde dann durch Trypsin entfernt und eine DHBV-DNA-spezifische PCR durchgeführt. Diese zeigte, dass die Fraktion der vor der Protease geschützten, intrazellulären Viren in behandelten und unbehandelten Zellen gleich war (**Abb. 3.2.6**, Spuren 4 bis 6).

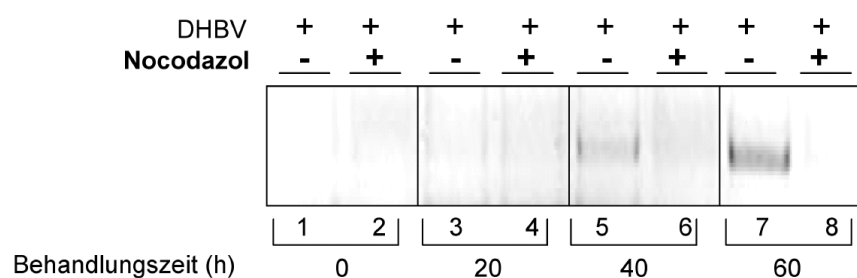
Diese Daten belegten, dass weder die Zerstörung der MTs durch Nocodazol noch deren Inaktivierung durch Paclitaxel einen nachweisbaren Effekt auf die Effizienz und Kinetik der DHBV-Internalisierung hat. Daher war der Block der DHBV-Infektion in MT-inaktivierten Zellen wahrscheinlich auf die Inhibition eines Schrittes nach der Bindung und Aufnahme zurückzuführen.



### 2.1.5 Fehlen der cccDNA-Bildung ohne intakte Mikrotubuli

Die oben beschriebenen Daten deuteten darauf hin, dass MTs für einen frühen Schritt der hepadnaviralen Infektion benötigt werden, der jedoch nach der viralen Bindung und Aufnahme auftritt. Um zu untersuchen, ob dieser Schritt vor dem Transport des viralen Genoms in den Nukleus stattfindet, wurde die Menge der intranukleären viralen cccDNA nach MT-Inaktivierung untersucht. Die cccDNA wird von in die Zelle eintretenden rc-Genomen durch ‚Reparatur‘ gebildet. Diese ‚Reparatur‘ ist etwa 20 h, nachdem das Virus in die Zelle eingetreten ist, vollständig und endet mit der Entstehung der cccDNA. Danach wird die Anzahl der cccDNA-Moleküle im Zellkern der infizierten Zelle durch ‚Re-Infektion‘ des Nukleus amplifiziert [38, 161]. Die Etablierung der cccDNA ist daher der erste nachweisbare Schritt, der auf eine erfolgreich etablierte, hepadnavirale Infektion hinweist.

Um den Effekt von Nocodazol auf den Genomtransport zu untersuchen, wurden PDHs für 1 h mit Nocodazol vorbehandelt. Anschließend wurde das Inokulum zugegeben und die Zellen wurden für 20 h bei 37°C inkubiert, ohne die Substanz zu entfernen. Danach wurde ein pH-Schock durchgeführt und neues Medium mit oder ohne Nocodazol auf die Zellen gegeben. 20 h, 40 h und 60 h später wurden die Zellen für die weitere Analyse mit Hilfe einer cccDNA-selektiven PCR geerntet.



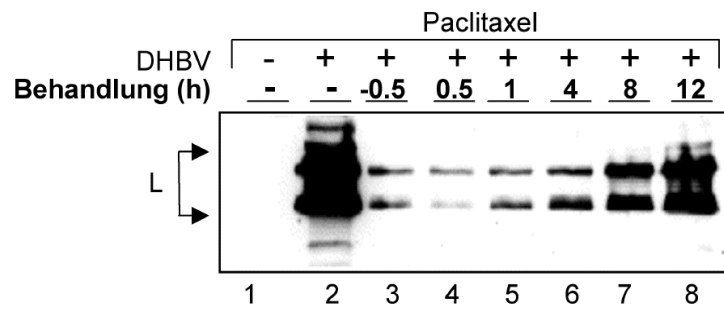
**Abb. 3.2.7 Keine cccDNA-Bildung in MT-inaktivierten Zellen.**

PDHs wurden für 1 h mit Nocodazol vorbehandelt und dann mit DHBV inokuliert. Nach 20 h Inkubation wurden die Kulturen gewaschen und ein pH-Schock durchgeführt. Neues Medium mit oder ohne Nocodazol wurde zugegeben und die Zellen wurden nach den aufgeführten Zeiträumen geerntet. Die cccDNA wurde isoliert und durch eine PCR mit Primern nachgewiesen, die in der Lückenregion des viralen Genoms binden.

In diesem Assay war in der Abwesenheit von MTs keine cccDNA nachweisbar (**Abb. 3.2.7**, Spuren 2, 4, 6, 8). Da Nocodazol weder die Virusbindung noch die Aufnahme einschränkte, kann aus diesem Experiment geschlossen werden, dass MTs eine kritische Rolle bei einem Transportschritt spielen, der sich nach der viralen Bindung und Aufnahme, aber vor der Ankunft des viralen Genoms im Nukleus ereignet.

#### 2.1.6 MT-abhängige Prozesse sind nur zu bestimmten Zeitpunkten angreifbar

Die bisherigen Daten deuteten darauf hin, dass MTs eine kritische Rolle bei einem Infektionsschritt nach der viralen Bindung und Aufnahme, aber vor der Ankunft des Genoms im Kern spielen. Dies warf verschiedene Fragen auf: Von welchem Zeitpunkt an werden MTs nach der Virusaufnahme benötigt und wie lange danach? Gibt es eine kritische Zeitspanne, während der die MT-Inaktivierung zu einem irreversiblen Block der Virusinfektion führt? Wenn das der Fall ist, was sind die Mechanismen? Um diese Fragen zu beantworten, wurde zuerst bestimmt, zu welchem Zeitpunkt nach der Virusaufnahme die MTs nicht mehr für eine produktive Infektion benötigt werden. Dazu wurde ein *add in*-Experiment durchgeführt. Kulturen wurden entweder für 30 min mit Paclitaxel vorbehandelt oder die Substanz wurde nach der Inokulation zu den angegebenen Zeitpunkten (30 min bis 12 h) zugegeben. Extrazelluläre virale Partikel wurden nach 16 h weiterer Inkubation durch Waschen entfernt und durch einen pH-Schock inaktiviert. Danach wurden die Zellen für weitere drei Tage ohne Inokulum und Substanz kultiviert. Als indirekter Marker für die Etablierung einer produktiven Infektion wurde dann die intrazelluläre L-Protein-Menge bestimmt.



**Abb. 3.2.8** Dynamische Mikrotubuli sind ab 8 h nach der Inokulation für die Infektion entbehrlich.

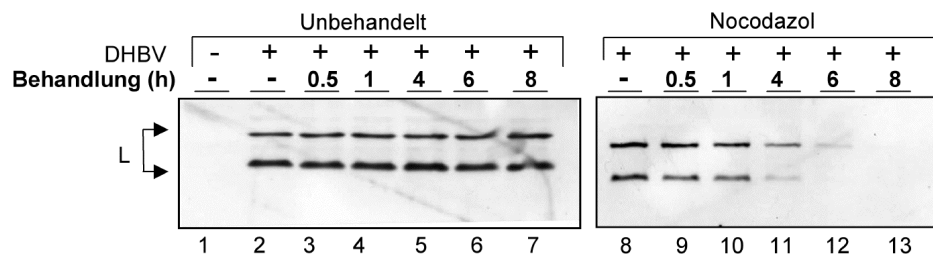
PDHs wurden entweder mit Paclitaxel vorinkubiert oder zu den angegebenen Zeitpunkten behandelt. Es wurde weitere 16 h inkubiert, bevor ein pH-Schock und ein Waschschrift durchgeführt wurden. Nach drei Tagen wurden die Zellen für den L-Immunblot geerntet. Abb. entnommen aus [162].

Dieser Assay zeigte, wie schon in meiner Diplomarbeit beschrieben, eine sehr niedrige Infektionseffizienz verglichen mit der Kontrolle, wenn die Zellen vorbehandelt oder bis zu 4 h nach der Inokulation behandelt wurden (**Abb. 3.2.8**, Spuren 2 bis 6) [162]. Die Inaktivierung der MTs 8 h oder 12 h nach der Inokulation zeigte keinen solch drastischen Effekt mehr auf den L-Gehalt und somit die produktive DHBV-Infektion (**Abb. 3.2.8**, Spuren 7 und 8).

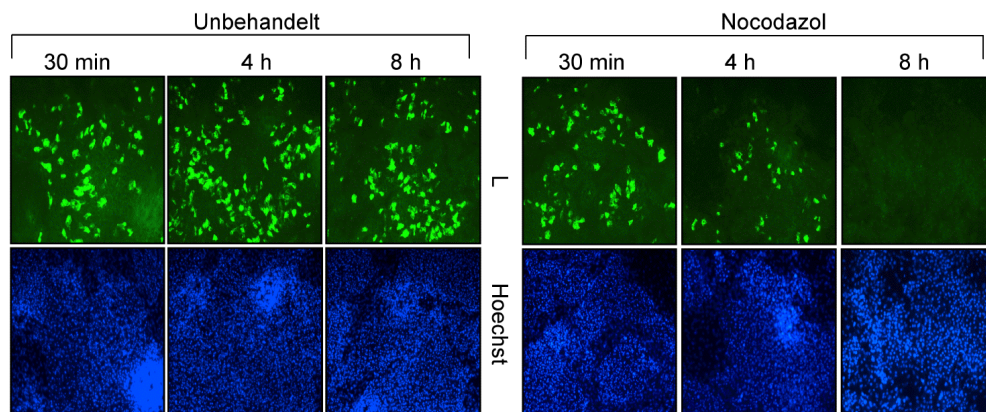
Diese Ergebnisse demonstrierten, dass der erfolgreiche intrazelluläre Transport von DHBV früh während der Infektion einen MT-abhängigen Schritt beinhaltet (bis 4 h nach Viruseintritt in die Zelle). Danach werden MTs zunehmend entbehrlicher. Außerdem zeigte sich überraschend, dass dieser Effekt irreversibel ist. Eine Infektion kam auch dann nicht zustande, wenn die inaktivierende Substanz 22 h nach der Inokulation entfernt wurde. Dies sollte zu einer schnellen Neuordnung der MTs für ungefähr drei Tage führen, bevor die Zellen geerntet wurden. Eine mögliche Erklärung für diesen irreversiblen Infektionsblock war die Annahme, dass internalisierte, aber arretierte Viren instabil sind und deren Infektiosität verändert wurde. Dies implizierte, dass zelluläre Enzyme virale oder subvirale Partikel nach der Aufnahme nicht degradieren können, solange diese für limitierte Zeiträume in bestimmten zellulären Kompartimenten geschützt sind. Dies ist höchstwahrscheinlich während der ersten 3 h bis 4 h nach einer Infektion der Fall. Wenn die Annahme korrekt ist, sollte die Zerstörung und Neuordnung der MTs während dieses Zeitraums für die Infektiosität der intrazellulären viralen Partikel kein

Risiko darstellen. Rekonstitution der MTs bis zu 4 h nach der Virusaufnahme sollte zu einer produktiven Infektion führen, während eine Neuorganisation zu späteren Zeitpunkten dies nicht erlauben sollte. Diese Hypothese wurde experimentell in einem *wash out*-Assay getestet. Dafür wurden Kulturen für 2 h bei 4°C mit DHBV inkubiert. Nicht-gebundenes Virus wurde entfernt und neues Medium mit oder ohne Nocodazol wurde zugegeben. Dann wurden die Zellen auf 37°C transferiert, um eine nahezu synchrone Aufnahme der Viren zu gewährleisten. Das Nocodazol wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (30 min bis 8 h) nach dem Transfer entfernt, um eine Reformation der MTs zu erlauben. Anschließend wurden die Zellen für weitere drei Tage inkubiert, dann geerntet und die produktive Infektion analysiert.

A



B



**Abb. 3.2.9 Inaktivierung der Mikrotubuli führt nach 6 h zu einem irreversiblen Block der Infektion.**

PDHs wurden für 2 h bei 4°C mit DHBV inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und Nocodazol zugegeben. Dann wurden die Kulturen auf 37°C erwärmt und zu verschiedenen Zeitpunkten gewaschen, um die Substanz zu entfernen. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen dann entweder fixiert oder für den Immunblot geerntet.

Der Nachweis von L in den Zelllysaten durch Immunblot zeigte keinen negativen Effekt, wenn die Zellen für bis zu 2 h mit Nocodazol behandelt wurden (**Abb. 3.2.9 A**, Spuren 8 bis 10). Eine zunehmende Inhibition wurde in diesem Assay beobachtet, wenn die Substanz nach 4 h bis 8 h entfernt wurde (**Abb. 3.2.9 A**, Spuren 11 bis 13). Immunfluoreszenzfärbung von L in den Zellen bestätigte diese Resultate und demonstrierte zusätzlich, dass die beobachtete Inhibition der Infektion hauptsächlich auf einer reduzierten Anzahl von infizierten Zellen in der Kultur beruhte und nicht auf einem reduzierten L-Gehalt in den einzelnen infizierten Zellen (**Abb. 3.2.9 B**).

Zusammenfassend waren die Daten in perfekter Übereinstimmung mit der Vorhersage, dass die Zerstörung der MTs während der ersten 4 h nach der Virusaufnahme nicht mit einer Infektion interferiert, wenn die MTs wieder reformieren können. Die MT-Zerstörung und damit die Arretierung der Viren für längere Zeiträume führen zu einem irreversiblen Block der viralen Infektion.

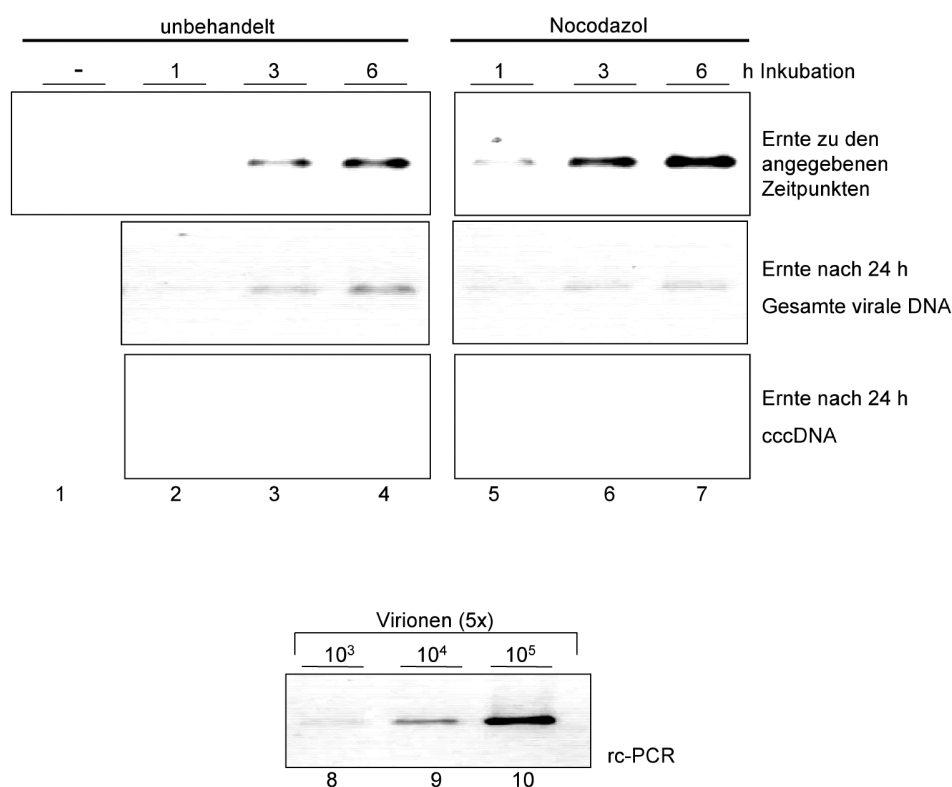
#### 2.1.7 Die Mehrzahl viraler Partikel ist nach der Aufnahme instabil und wird degradiert

Die Daten der obigen kinetischen Untersuchungen der MT-Abhängigkeit einer DHBV-Infektion wiesen darauf hin, dass eine Inhibition der MT-abhängigen, zellulären Prozesse zu bestimmten Zeitpunkten der viralen Aufnahme in einer abortiven Infektion resultiert. Demzufolge ist das Arretieren der eintretenden Virionen mit einem irreversiblen Verlust der Infektiosität verbunden. Um zu überprüfen, ob die arretierten Partikel (die frei im Zytoplasma oder in Vesikeln vorliegen könnten) instabil waren und eine proteolytische Degradation stattfand, wurde ein Assay etabliert, der erlaubte, die Stabilität der Zell-assoziierten viralen Partikel (Virionen und SVPs) zu überprüfen.

In diesem Assay wurde zuerst die Konversion der eintretenden rc- zu cccDNA überprüft, um die Stabilität der internalisierten Virionen zu untersuchen. Das Verhältnis von eintretender rcDNA zu cccDNA ist ein guter Anhaltspunkt für die Stabilität der Virionen, da nur die aufgenommene rcDNA in cccDNA umgewandelt werden kann und so zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion die Zahl der cccDNA-Moleküle der Zahl der rcDNA-Moleküle entsprechen müsste, wenn alle rcDNA-Moleküle im Nukleus ankommen und konvertiert werden.

Sollte weniger cccDNA im Vergleich zur rcDNA nachweisbar sein, so konnte angenommen werden, dass die Differenz der rcDNA-Moleküle abgebaut wurde. Außerdem wurde der Effekt verschiedener Proteasen auf die Stabilität der Hüllproteine eintretender viraler Partikel in Hepatozyten bestimmt.

Zuerst wurden PDHs mit DHBV (MGE 220) bei 37°C für 1 h, 3 h oder 6 h in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Nocodazol inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen gewaschen, um ungebundenes Virus zu entfernen und entweder direkt in PCR-Lysepuffer aufgenommen oder weitere 24 h vor der Ernte inkubiert. Die Menge der gesamten Zell-assoziierten, viralen DNA und die Menge der cccDNA wurden durch semi-quantitative PCR mit den entsprechenden Primern bestimmt.

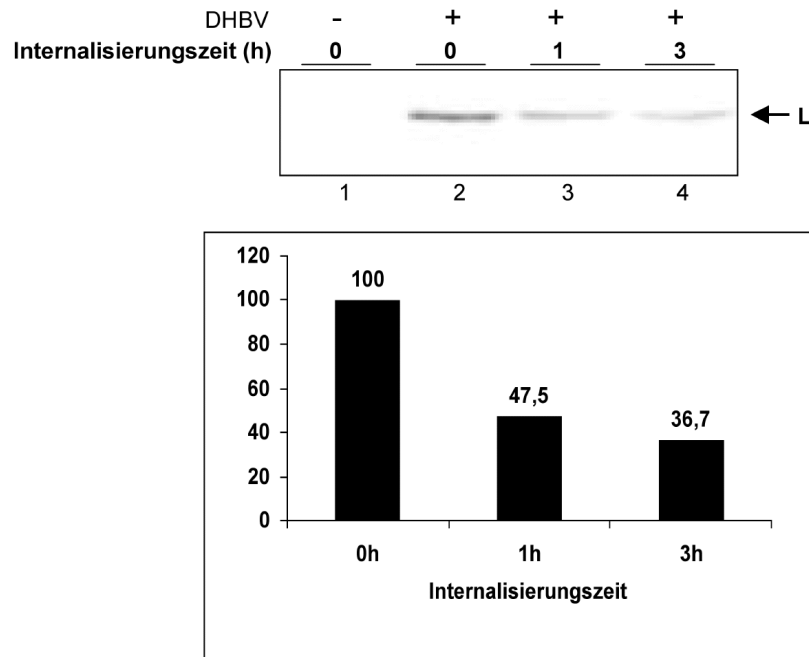


**Abb. 3.2.10 Inaktivierung der MTs durch Nocodazol destabilisiert die virale DNA.**

PDHs wurden für unterschiedliche Zeiträume inkuliert (MGE 220) und entweder mit Nocodazol behandelt oder nicht. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturen entweder direkt (oben) oder 24 h später (unten) geerntet. Anschließend wurde eine rc- oder cccDNA-selektive PCR mit den Proben nach einem Proteinase K-Verdau durchgeführt.

Diese Analyse zeigte, dass die Menge der viralen DNA, die mit den Zellen assoziiert war, mit steigender Inkubationszeit anstieg (**Abb. 3.2.10**). In den Kulturen, die mit Nocodazol behandelt wurden, war die Menge der viralen DNA zu allen Zeitpunkten der ersten Ernte höher als in den unbehandelten Kontrollen (**Abb. 3.2.10**, Spuren 2 bis 4 und 5 bis 7). Dieses Ergebnis wurde erwartet und war mit oben beschriebenen Untersuchungen (**Abb. 3.2.2**) konsistent, da die Gesamtmenge der viralen DNA nachgewiesen wurde (d.h. Bindung und Internalisierung), und nach einer Zerstörung der MTs die Bindung an die Kulturen erhöht war. Interessanterweise war die Menge der viralen DNA 24 h nach der Inokulation zu allen analysierten Zeitpunkten stark um etwa zwei log-Stufen reduziert. In mit Nocodazol behandelten Zellen war das DNA-Signal stärker reduziert als in den Kontrollzellen. Diese Reduktion der Gesamt-Virus-DNA wurde nicht von einem Anstieg der cccDNA begleitet, was darauf hindeutet, dass nur wenige rcDNA-Genome in cccDNA umgewandelt werden. Dies könnte bedeuten, dass die Mehrzahl der aufgenommenen viralen Partikel degradiert wurde und dass diese Degradation in Zellen ohne funktionelle MTs effizienter ablief.

Um zu bestätigen, dass die aufgenommenen viralen Partikel instabil waren, wurde ein Internalisierungsexperiment durchgeführt. PDH-Kulturen wurden mit 220 MGE inokuliert und die Partikel für 2 h bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden. Anschließend wurden die Kulturen gewaschen und entweder direkt in Lämmli-Lysepuffer geerntet oder auf 37°C erwärmt. Diese Kulturen wurden entweder nach 1 h oder 3 h mit Trypsin geerntet. Dann wurde ein L-Immunblot durchgeführt und die Signale quantifiziert.



**Abb. 3.2.11 Das virale L-Protein ist nach der Internalisierung instabil.**

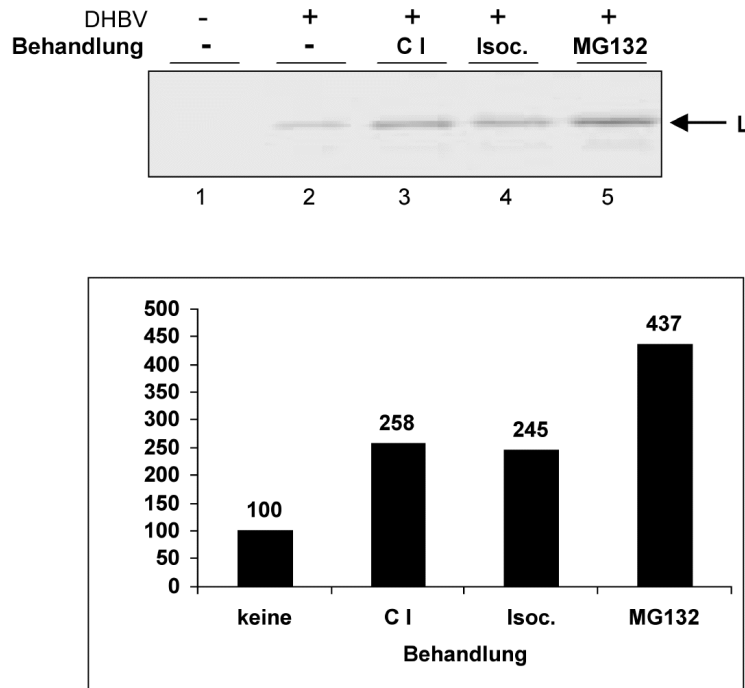
PDHs wurden mit 220 MGE inokuliert und ein Bindungs- und Internalisierungsassay durchgeführt. Die Proben wurden in Lämmli-Lysepuffer aufgenommen und durch eine SDS-PAGE fraktioniert. Anschließend wurde der L-Immunblot durchgeführt. Die Signale wurden mit einem Multimager aufgenommen und quantifiziert. Sie sind im Graph als Prozent im Vergleich zum Signal der initialen Bindung angegeben.

Dieser Versuch zeigte deutlich, dass das virale Oberflächenprotein L mit einer Halbwertszeit von ca. 1 h in den Zellen abgebaut wird und nach der Internalisierung im Vergleich zur Oberflächen-gebundenen Menge stark reduziert ist (**Abb. 3.2.11**). Dies deutete darauf hin, dass das L-Protein der Mehrzahl der aufgenommenen viralen Partikel in einem Zeitraum von 3 h degradiert wird.

Um zu untersuchen, ob bestimmte Proteasen die aufgenommenen viralen Partikel destabilisieren und zum Abbau von L führen, wurde das folgende Experiment mit verschiedenen Proteaseinhibitoren durchgeführt. Es wurden ein Cysteinproteaseinhibitor (Calpaininhibitor I C I), ein Serinproteaseinhibitor (Dichlorisocoumarin, Isoc.) und ein Proteasominhibitor (MG132) eingesetzt. PDHs wurden mit virämischem Serum 2 h bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene virale Partikel wurden anschließend gewaschen und neues Medium, das die einzelnen Proteaseinhibitoren enthielt, wurde zugegeben, bevor die Kulturen



auf 37°C erwärmt wurden. Anschließend wurden die Zellen für 3 h inkubiert, mit Trypsin behandelt und in Lämmli-Lysepuffer geerntet. Der Abbau des L-Proteins und somit wahrscheinlich der viralen Partikel wurde mit einem L-Immunblot analysiert.



**Abb. 3.2.12 Proteaseinhibitoren stabilisieren das virale L-Protein.**

PDHs wurden mit 220 MGE inokuliert und ein Internalisierungsassay in der Gegenwart der angegebenen Proteaseinhibitoren durchgeführt. Die Kulturen wurden nach Trypsinbehandlung in Lämmli-Lysepuffer geerntet und ein L-Immunblot durchgeführt. Die Signale wurden mit einem Multimager aufgenommen und quantifiziert. Sie sind im Graph als Prozent im Vergleich zum Signal der initialen Bindung angegeben. C I (Calpaininhibitor I), Isoc. (Dichlorisocoumarin).

Dieser Assay zeigte, dass die intrazelluläre L-Menge in unbehandelten Kulturen relativ gering war (**Abb. 3.2.12**, Spur 2). Im Gegensatz dazu resultierte die Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Proteaseinhibitoren in einem Anstieg des L-Signals, der vom verwendeten Inhibitor abhing (**Abb. 3.2.12**, Spuren 3 bis 5). Behandlung der Zellen mit MG132, das primär die Proteasomen inhibiert, hatte den offensichtlich stärksten Effekt und führte zu einem vierfachen Anstieg des intrazellulären L-Protein-Gehalts im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Inhibition der Cystein- und Serinproteasen mit dem Calpaininhibitor I und Dichlorisocoumarin hatte einen zweifachen Effekt. Dies

deutet auf die Beteiligung mehrerer Proteasen beim L-Abbau hin, wobei das Proteasom eine besonders prominente Rolle zu spielen scheint.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass virale Partikel nach der Aufnahme in die Hepatozyten einer ‚feindlichen‘ Umgebung ausgesetzt werden, die dazu führt, dass die Mehrzahl der viralen Partikel abgebaut wird.

## **2.2 Diskussion**

Die Zeitspanne, die benötigt wird, bis die erste Kopie der hepadnaviralen cccDNA nach einer Infektion nachweisbar ist, wurde mit ungefähr 20 h angegeben [38]. Wenn man diese Zahl sowie die maximal benötigte Zeit für die Virusaufnahme (3 h) berücksichtigt, bleiben mindestens 17 h für den intrazellulären Transport des Virus im Zytoplasma, den Kerntransport und die Umwandlung von rc- in cccDNA. Dieser lange Zeitraum kann durch einen ungewöhnlichen, restriktiven Prozess bedingt sein. In jedem Fall legen die Resultate nahe, dass es einen limitierenden Schritt nach der hepadnaviralen Aufnahme gibt, der bis jetzt für kein anderes Virus beschrieben wurde.

Das Zytoskelett hätte bei der Virusbindung an die Zelloberfläche (z.B. durch die Aufrechterhaltung von Plasmamembranstrukturen) eine kritische Rolle spielen können. Die oben beschriebenen Daten weisen jedoch darauf hin, dass sowohl intakte Aktin- als auch Tubulinfilamente für eine hepadnavirale Bindung entbehrlich sind. Die vermehrte virale Bindung nach Zerstörung des Zytoskeletts deutet auf kryptische Bindungsstellen für die Viren hin, die nach einer Behandlung der Zellen mit Zytoskelett-zerstörenden, aber nicht stabilisierenden Substanzen zugänglich werden. Enge Zell-Zell-Verbindungen, Mikrovilli oder Plasmamembran-Einstülpungen könnten solche Bindungsstellen enthalten. Da die Bildung und Aufrechterhaltung dieser Strukturen wenigstens teilweise auf einem intakten Zytoskelett beruht, könnte der diffusionskontrollierte Zugang der Viren zu diesen Stellen nach Zerstörung des Zytoskeletts erleichtert werden.

Den hier gezeigten Daten zufolge hat die Zerstörung des submembranösen, dichten Aktinkortex keinen negativen Effekt auf die DHBV-Aufnahme, den zytoplasmatischen Transport oder den Genomtransfer in den

Nukleus. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da andere Viren wie HIV, Adenoviren, SV40 und Vacciniaviren ein intaktes Aktinskelett für die virale Aufnahme und die Etablierung einer Infektion benötigen [159]. Dies weist auf eine weitere Besonderheit in den frühen Schritten des hepadnaviralen Lebenszyklus hin.

Sind die Hepadnaviren einmal in die Wirtszelle eingedrungen, müssen sie das virale Genom zum Nukleus transportieren, um die virale Replikation zu initiieren. Dieser gerichtete Transport eindringender viraler Partikel, die entweder frei im Zytoplasma oder Membran-gebunden in endosomalen Kompartimenten vorliegen können, beruht höchstwahrscheinlich auf dem Zytoskelett der Wirtszelle. Die Daten dieser Studie zeigen, dass MTs im Gegensatz zum Aktinskelett früh in der DHBV-Infektion eine essentielle Rolle spielen. Mehr noch: Der erfolgreiche Transport viraler Partikel benötigt sowohl intakte als auch dynamische MTs. DHBV unterscheidet sich in diesem Aspekt meines Wissens nach von allen anderen untersuchten Viren, die diese MT-Dynamik normalerweise nicht benötigen [163, 164]. Der intrazelluläre Transport von Papovaviren z.B. beruht auf der Integrität (zerstörbar durch Nocodazol), aber nicht auf der Dynamik (inhibierbar durch Paclitaxel) der Mikrotubuli [165]. Die hier gezeigten Daten sind konsistent mit der Annahme, dass Viren für ihre intrazelluläre Beweglichkeit Zytoskelettelemente benötigen und bieten ein neues Beispiel für die Variation der Strategien, die von verschiedenen Viren genutzt werden.

Die Inhibition der DHBV-Infektion in Zellen ohne funktionelle MTs war sehr stark, aber nicht komplett. Die residuale Infektion, die in behandelten Zellen beobachtet werden konnte, könnte auf die unvollständige Inaktivierung der MTs durch die benutzten chemischen Substanzen zurückzuführen sein oder auf der Existenz eines MT-unabhängigen Nebenweges für die Etablierung einer Infektion beruhen, der auch Diffusion beinhalten könnte. Alternativ könnten einige intrazelluläre Viren nach der Neuorganisation der MTs in der Lage sein, den Nukleus zu erreichen und ein niedriges Infektionsniveau zu etablieren. Zusätzlich könnte Glu-Tubulin, eine Nocodazol-resistente Variante des  $\alpha$ -Tubulin, den Transport von DHBV nach einer Nocodazol-Behandlung in geringem Ausmaß übernehmen [166].

Die Daten zeigen, dass MTs für einen Infektionsschritt nach der viralen Aufnahme im Lebenszyklus von DHBV essentiell sind. Zusammen mit dem Fehlen der cccDNA-Bildung in MT-inaktivierten Zellen legen die Daten eindeutig nahe, dass MTs eine zentrale Rolle bei einem Infektionsschritt spielen, der nach der viralen Bindung und Aufnahme, aber vor dem Transport der viralen Genome in den Zellkern erfolgt. Die Frage, welcher konkrete Schritt(e) von intakten MTs abhängt und welcher Mechanismus involviert ist, bleibt jedoch offen. Die korrelative kinetische Analyse von MT-Inaktivierung und DHBV-Infektion zeigt, dass der infektionslimitierende, MT-sensitive Schritt zwischen 4 h und 8 h nach der Inokulation stattfindet. Depolymerisierung und Reformation der MTs 4 h nach der viralen Aufnahme oder früher interferierte nicht signifikant mit der Etablierung einer produktiven Infektion. Eine Zerstörung der MTs mit nachfolgender Reformation nach dieser Zeitspanne führte zu einer fast kompletten Inhibition der Infektion. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Verlust der Infektiosität von intrazellulären viralen Partikeln durch einen Arrest der MT-vermittelten Beweglichkeit während einer frühen Phase im viralen Lebenszyklus irreversibel ist. Der Grund für diese ungewöhnliche Beobachtung ist unklar. Mir ist kein anderes Virus bekannt, das ein ähnliches Verhalten zeigt [163, 167]. Intrazelluläre virale Partikel, frei oder in Vesikeln, scheinen ihre Infektiosität unabhängig von einer Verbindung zu MTs zu behalten, solange sie für nur limitierte Zeiträume arretiert sind und sich in bestimmten zellulären Kompartimenten befinden. Eine Verlängerung dieses Transportblocks resultierte in einem rapiden Verlust der viralen Infektiosität. Dies deutet auf ein MT-abhängiges und streng reguliertes Schlüsselereignis im viralen Lebenszyklus hin. Im Fall von SV40 wurde beschrieben, dass ein MT-abhängiger Schritt zwischen 3 h und 6 h nach der Infektion auftritt [130]. Dieser vermittelt den Transport von SV40 vom Caveosom zu Strukturen des glatten ER. Obwohl Endozytose als ein Aufnahmeweg für DHBV vorgeschlagen wurde [60], sind der Mechanismus und die darauf folgenden Schritte unbekannt. Daher ist es unmöglich, die oben beschriebenen Daten einer bestimmten Stufe im hepadnaviralen Eintrittsmechanismus zuzuordnen. Der MT-sensitive Schritt könnte jedoch einen zu SV40 analogen Transportschritt reflektieren und enthält wahrscheinlich einen MT-vermittelten Nukleokapsid- und Genomtransport. Diese spekulative Annahme wird durch das Ergebnis unterstützt, dass in MT-

gestörten PDHs das virale Genom anscheinend nicht in den Zellkern gelangt oder nicht in cccDNA umgewandelt und amplifiziert wird, sondern vorher degradiert wird.

Der hepadnavirale Genomtransport könnte von einem Prozess gesteuert werden, der von dem Verlust der viralen Hülle sowie der Nukleokapsid-Maturation abhängt und durch eine Assoziation mit MTs erleichtert wird. MTs können als bevorzugter Ort für die virale Maturation nach dem Eintritt in die Wirtszelle dienen, wie zuvor für HIV gezeigt wurde [168].

Die fortgesetzte Unterbrechung des zeitlich koordinierten, intrazellulären Transports der viralen Partikel könnte letztendlich ihre Anfälligkeit für proteolytische Prozessierung und Zerstörung erhöhen. Konformationsänderungen in den Strukturproteinen, insbesondere in den Hüllproteinen, von denen angenommen wird, dass sie nach der viralen Bindung, Aufnahme und dem Verlust der Hülle vorkommen, könnten diese erhöhte Anfälligkeit für Degradation erklären. Eindringende virale Partikel und Proteine könnten von der Zelle wahrgenommen und schon im Zytoplasma durch die proteolytische Maschinerie der Wirtszelle zerstört werden. Diese Spekulation wird durch den Befund unterstützt, dass das virale Hüllprotein L sehr instabil ist und durch zelluläre Proteasen (u.a., aber nicht ausschließlich, dem Proteasom) angegriffen wird. Dies weist darauf hin, dass die funktionelle Integrität der aufgenommenen viralen Partikel während der frühen Phase der Infektion für proteolytische Degradation angreifbar ist. Dieser proteolytische Abbau als Teil der zellulären antiviralen Antwort könnte jedoch zugleich den Verlust der viralen Hülle hervorrufen, der wahrscheinlich für die Etablierung einer Infektion benötigt wird. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Stabilität der viralen DNA sich stark von der des L-Proteins als einer Komponente der viralen Hülle unterscheidet. L wird schon sehr früh während oder nach der Aufnahme der viralen Partikel abgebaut, während die virale DNA wesentlich länger persistiert. Eine längere Unterbrechung des viralen Transports durch Inaktivierung der MTs könnte die Viren für die proteolytische Zerstörung zugänglicher machen. Die Beobachtung, dass die Stabilität der DNA-haltigen Partikel nach einer Nocodazol-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen stark verringert ist, ist mit der obigen Hypothese konsistent. Die hier vorgestellten Daten unterstützen die Annahme, dass der

MT-vermittelte Transport von Viren auch Teil der zellulären antiviralen Antwort sein kann, die dazu führt, dass die Viren zu Aggreasomen transportiert werden, wo ein proteolytischer Abbau stattfindet [144].

Der infektiöse Aufnahmeweg von Hepadnaviren beinhaltet eine Serie von koordinierten und angreifbaren Schritten, bevor das virale Genom im Kern ankommt und eine produktive Infektion etabliert wird. Diese frühen Schritte scheinen dafür verantwortlich zu sein, dass Hepatitis B-Viren verschiedene replikationskompetente Hepatomzelllinien nicht infizieren können. Die Daten und Methoden, die hier vorgestellt wurden, könnten dabei helfen, die Einschränkungen von Zelllinien zu analysieren und zu überwinden. Dies könnte durch Rekonstitution der defektiven Schritte geschehen und den Weg für die Etablierung permissiver Zelllinien ebnen. Solche permissiven Zelllinien oder auch Tiermodelle sind Voraussetzung für die Entwicklung neuer antiviraler Strategien, die dringend benötigt werden. Es ist außerdem deutlich, dass Substanzen, die mit der viralen Bindung, dem intrazellulären Transport und dem Import des viralen Genoms in den Zellkern interferieren, potente Inhibitoren der viralen Infektion darstellen. Ein vollständigeres Verständnis über die Art von Wirtsfaktoren und deren Nutzung durch Hepadnaviren für die Etablierung einer Infektion, ist jedoch nötig, um diesem Ziel näher zu kommen bzw. es zu erreichen.

Um die erhaltenen Ergebnisse auszuweiten, sollte untersucht werden, wie das Virus genau in der Zelle transportiert wird. Dies beinhaltet die Frage, ob es nach der Aufnahme in Endosomen vorliegt und in diesen transportiert wird oder, ob das virale Partikel frei im Zytosol an die MTs bindet. Dies könnte durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen das Kapsidprotein erreicht werden. Dieses Protein wäre nur zugänglich, wenn die Kapside frei im Zytoplasma vorliegen. Außerdem sollten Untersuchungen meiner Diplomarbeit ausgeweitet werden, die zeigten, dass das Motorprotein Dynein wahrscheinlich am Transport von DHBV in der Zelle beteiligt ist [162]. In weiteren Analysen sollte die Frage der viralen Stabilität beantwortet werden. Die hier verwendeten Proteaseinhibitoren könnten in Kombination mit Nocodazol zur Aufklärung der Irreversibilität nach der MT-Inaktivierung führen.

### **3. Cholesterin als essentieller Faktor für die Etablierung einer DHBV-Infektion**

Sezernierte hepadnavirale Partikel weisen bei ihrer Lipidzusammensetzung eine gewisse Ähnlichkeit mit dem HDL (*high density lipoprotein*, Lipoprotein hoher Dichte) auf [169]. Obwohl sie einen sehr hohen Proteinanteil haben, enthalten sie auch eine Vielzahl Lipide. Dabei sind die Hauptlipidbestandteile Phosphatidylcholin (60 % aller Lipide), Cholesterylester (14 %), Cholesterin (15 %) und Triglyceride (3 %) [22]. Über die Rolle dieser Lipide im hepadnaviralen Lebenszyklus ist bis heute noch nichts bekannt. Es wurde jedoch festgestellt, dass sich die Lipidzusammensetzung der viralen Membran grundlegend von der der ER-Membran aus der die Partikel stammen, unterscheidet [169]. Dies weist auf eine selektive Inkorporation oder den Ausschluss bestimmter Lipide in der viralen Membran während der Assemblierung hin.

In der Plasmamembran verschiedener Zellen ist Cholesterin oft angereichert in so genannten *lipid rafts* und Caveolae (siehe Kapitel II.2.2.2). Caveolae sind gut definierte *lipid rafts*, die einen hohen Gehalt an Cholesterin aufweisen und eine Eintrittspforte für Viren in die Wirtszelle darstellen können [129, 170]. Bis heute ist jedoch unbekannt, ob *lipid rafts* eine Rolle bei der Aufnahme von Hepadnaviren spielen.

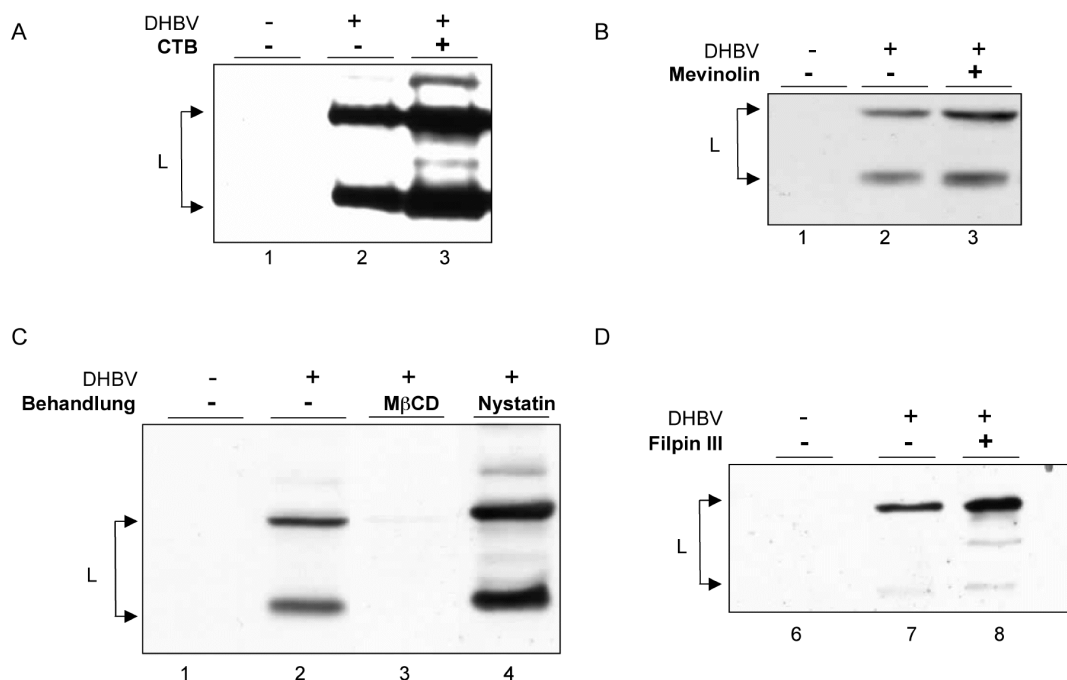
Aufgrund der oben genannten offenen Fragen wurde untersucht, ob zelluläre *lipid rafts* eine Rolle bei der Etablierung einer produktiven DHBV-Infektion spielen. In analogen Experimenten wurde die Rolle des Cholesterins in der viralen Membran untersucht.

#### **3.1 Ergebnisse**

##### 3.1.1 Inaktivierung der *lipid rafts* hat keinen Einfluss auf die Etablierung einer DHBV-Infektion

Um die Notwendigkeit intakter *lipid rafts* bei der Etablierung einer DHBV-Infektion zu untersuchen, wurden verschiedene chemische Inhibitoren für

Infektionsinterferenzexperimente eingesetzt, die bekanntermaßen eine Infektion mit Viren verhindern, die *lipid rafts* als produktive Pforte in die Zelle nutzen [171]. Primäre Entenhepatozyten wurden mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD), Filipin III, Nystatin, Cholera-Toxin Untereinheit B (CTB) oder Mevinolin vorbehandelt. M $\beta$ CD bindet Cholesterin sehr effizient und entzieht es so hauptsächlich der Plasmamembran [172]. Filipin III und Nystatin binden Cholesterin und chelatieren es [173]. CTB bindet das Gangliosid M1 und wird über Caveolae aufgenommen; es kompetiert daher mit der Aufnahme anderer Substanzen über diesen Weg [174]. Mevinolin inhibiert das Hauptenzym der Cholesterin-Synthese und führt bei längerer Behandlung der Zellen zu einer Depletion des endogenen Cholesterins [175]. Die Vorbehandlung wurde daher in diesem Fall von 1 h auf 24 h erhöht. Nach der Vorbehandlung wurde das Inokulum zugegeben und die Zellen über Nacht inkubiert. Danach wurden die Substanzen und das Inokulum durch Waschen entfernt und die Zellen weitere drei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen geerntet und ein Immunblot für das virale Oberflächenprotein L als Indikator einer produktiven Infektion durchgeführt.



**Abb. 3.3.1** *Lipid rafts* vermitteln keine produktive DHBV-Aufnahme in PDHs.

PDHs wurden 1 h mit CTB (A), M $\beta$ CD oder Nystatin (C), Filipin III (D) oder 24 h mit Mevinolin (B) vorbehandelt. Dann wurden die Zellen mit 220 MGE inokuliert



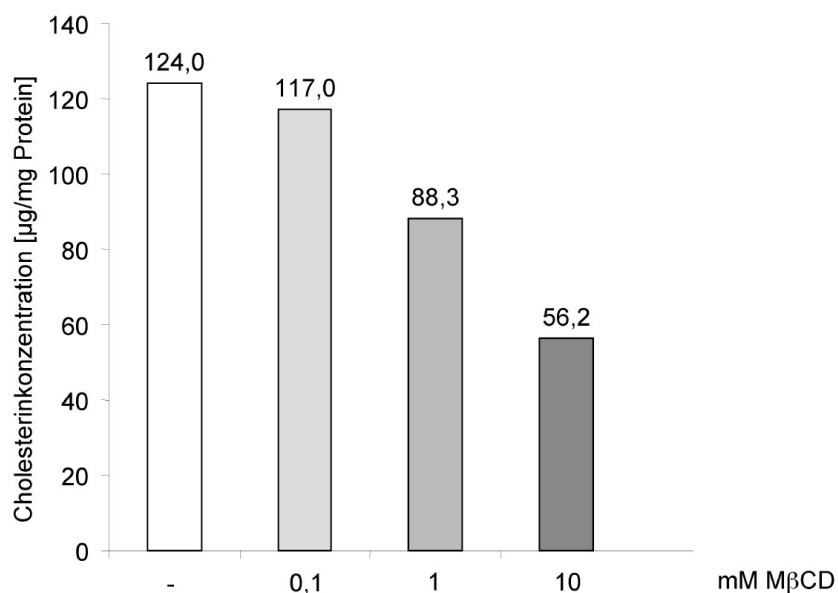
und über Nacht inkubiert. Das Medium wurde gewechselt und die Kulturen weitere drei Tage ohne Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden sie in Lämmli-Lysepuffer geerntet und ein Teil der Lysate durch SDS-PAGE fraktioniert. Der Immunblot wurde mit dem Anti-preS-Antikörper Kpnl durchgeführt. Einige Signale wurden mit einem Multimager quantifiziert.

Vorbehandlung der Kulturen mit CTB führte nicht zu einer signifikanten Reduktion des L-Signals im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Abb. 3.3.1 A**). Es konnte daher keine Konkurrenz von CTB mit der Etablierung einer produktiven Infektion festgestellt werden. DHBV scheint nicht an das Gangliosid M1 zu binden, um eine produktive Infektion zu etablieren. Auch die leichte Cholesterindepletion, die mit einer Mevinolin-Behandlung erreicht werden konnte, zeigte keinen negativen Einfluss auf eine produktive Infektion (**Abb. 3.3.1 B**). Die Vorbehandlung der Zellen mit Nystatin oder Filipin III zeigte in diesem Experiment keine stark negativen Effekte auf die produktive Infektion (**Abb. 3.3.1 C und D**). Die L-Menge schien sogar leicht erhöht. Diese letztgenannten Substanzen senken die Menge des in einer Membran befindlichen Cholesterins etwa 20 % und 30 % ab und inaktivieren so eine *lipid raft*-vermittelte Aufnahme [176]. Zusammen deuteten diese Daten darauf hin, dass DHBV nicht durch *lipid rafts* in die Wirtszelle aufgenommen wird, um eine produktive Infektion zu etablieren.

Im Gegensatz zu den obigen Substanzen zeigte eine Behandlung der Zellen mit M $\beta$ CD jedoch eine stark inhibitorische Wirkung (**Abb. 3.3.1 C**, Spuren 1 bis 3). Die Menge an L in den behandelten Zellen betrug nur 1 % der Menge von unbehandelten Zellen. Da bekannt ist, dass diese Behandlung die Cholesterinlevel in Membranen wesentlich effektiver als Nystatin oder Filipin III reduziert [176], deutete dies darauf hin, dass Cholesterin eine essentielle Rolle bei der Etablierung einer produktiven DHBV-Infektion spielt, *lipid rafts* jedoch wahrscheinlich nicht beteiligt sind.

Um zu überprüfen, ob durch die einstündige M $\beta$ CD-Behandlung das Cholesterin effektiv depletiert wurde, wurde der Cholesteringehalt der behandelten Kulturen untersucht. Dazu wurden PDHs für 1 h mit unterschiedlichen Konzentrationen M $\beta$ CD behandelt, dann in PBS abgeschabt und pelletiert. Anschließend wurde von J. Heeren vom Universitätsklinikum

Eppendorf, Hamburg der Cholesteringehalt in einem kolorimetrischen Assay bestimmt.

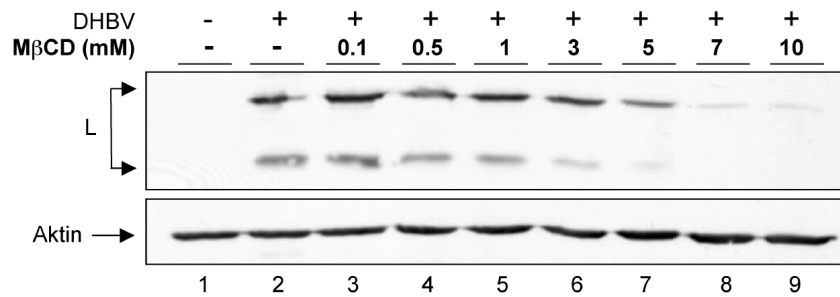


**Abb. 3.3.2 MβCD-Behandlung reduziert den Cholesteringehalt in PDH-Kulturen konzentrationsabhängig.**

PDHs wurden für 1 h mit den angegebenen Konzentrationen MβCD behandelt. Anschließend wurden die Kulturen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS abgeschabt. Nach der Pelletierung der Zellen wurde das Pellet eingefroren und an J. Heeren vom UKE übergeben.

Diese Untersuchung zeigte, dass der Cholesteringehalt der Zellen konzentrationsabhängig durch MβCD reduziert werden konnte. Die Konzentration von 10 mM, die in den vorherigen Experimenten verwendet wurde, reduzierte den zellulären Gehalt an Cholesterin auf 56,2 µg/mg zelluläres Protein (**Abb. 3.3.2**). Dies entsprach einer Reduktion von über 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

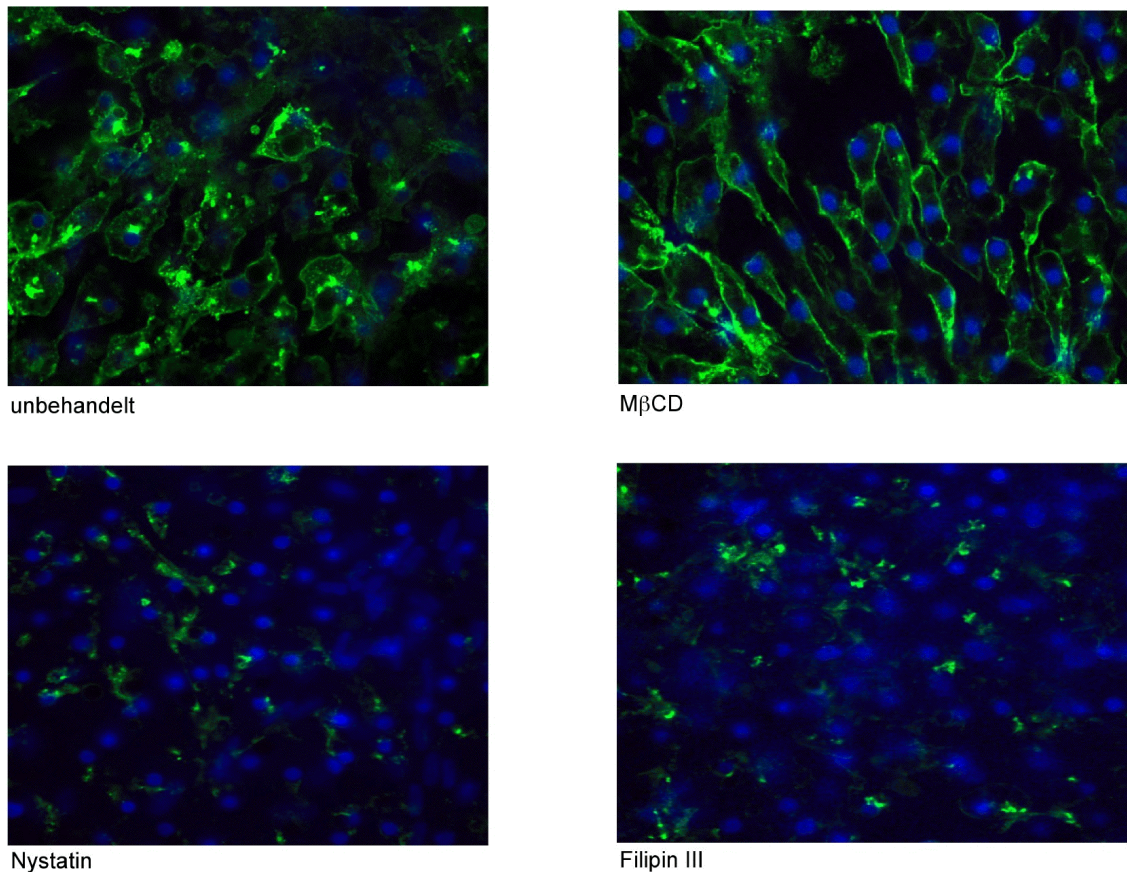
Um diese Daten nun mit der produktiven DHBV-Infektion zu korrelieren, wurden PDH-Kulturen für 1 h mit unterschiedlichen MβCD-Konzentrationen vorbehandelt. Anschließend wurden sie mit DHBV inokuliert, während die Substanz sich noch im Medium befand. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach weiteren drei Tagen für die Analyse der produktiven Infektion geerntet.



**Abb. 3.3.3 Die Inhibition der produktiven DHBV-Infektion ist konzentrationsabhängig.** PDHs wurden 1 h mit den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Anschließend wurde inokuliert und über Nacht inkubiert. Das Medium wurde gewechselt und die Kulturen nach weiteren drei Tagen in Lämmli-Lysepuffer geerntet. Dann wurde ein Immunblot für das L-Protein und Aktin durchgeführt.

Es zeigte sich, dass M $\beta$ CD ab einer Konzentration von 3 mM konzentrationsabhängig die produktive Infektion hemmte (**Abb. 3.3.3**). Die Konzentration, bei der die Infektion gegenüber der unbehandelten Kontrolle um etwa 50 % reduziert war, lag bei 5 mM. Dies entsprach einer Anzahl von insgesamt  $3 \times 10^8$  Molekülen auf  $5 \times 10^5$  Zellen, also 600 M $\beta$ CD-Molekülen pro Zelle. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die M $\beta$ CD-Konzentration relativ hoch sein muss, um einen inhibitorischen Effekt auf die Infektion zu erreichen. Ein großer Teil des Cholesterins muss daher den Membranen entzogen werden, um einen inhibitorischen Effekt zu haben.

Um den Effekt der benutzten Inhibitoren auf die *lipid raft*-vermittelte Aufnahme zu untersuchen, wurde folgendes Kontrollexperiment durchgeführt. PDHs wurden mit einigen Substanzen vorbehandelt und anschließend mit FITC-CTB inkubiert. Die B-Untereinheit des Cholera-Toxins wird über Caveolae in die Zellen aufgenommen und diente hier als Indikator für die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen [174].



**Abb. 3.3.4** Die Aufnahme von FITC-CTB ist nach Inaktivierung der *lipid rafts* stark reduziert.

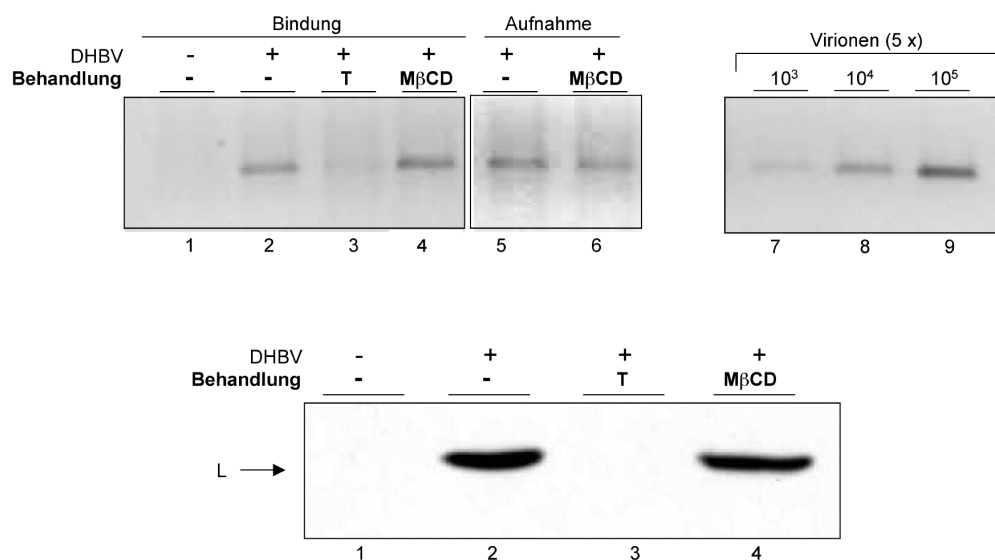
PDHs wurden mit den angegebenen Substanzen für 1 h vorbehandelt und anschließend mit 5 µg/ml FITC-CTB (grün) für 2 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 3,7 % Paraformaldehyd fixiert, die Nuklei mit Hoechst (blau) angefärbt und im konfokalen Laserscanningmikroskop analysiert.

Alle Substanzen reduzierten die Aufnahme von FITC-CTB stark (**Abb. 3.3.4**). Im Falle von Nystatin und Filipin III war dies auf eine stark verringerte Bindung des FITC-CTB zurückzuführen. Im Gegensatz dazu interferierte MβCD mit der FITC-CTB-Aufnahme, da eine starke Akkumulation von FITC-CTB an der Zytoplasmamembran zu beobachten war.

Zusammen kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass Caveolae vermutlich bei der DHBV-Aufnahme in Wirtszellen keine Rolle im Sinne einer produktiven Infektion spielen. Dies schließt jedoch nicht aus, dass andere *lipid rafts* bei der Aufnahme von DHBV beteiligt sind.

### 3.1.2 DHBV bindet und wird von Wirtszellen nach Cholesterindepletion aufgenommen

Eine mögliche Erklärung für die stark reduzierte Infektion war, dass die M $\beta$ CD-Behandlung die Oberfläche der Zellen so veränderte, dass die Viren sie nicht mehr effizient banden oder in sie eindringen konnten. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde ein Bindungs- und Internalisierungsassay durchgeführt. Dazu wurden PDHs mit M $\beta$ CD vorbehandelt und dann das Virus bei 4°C an die Oberfläche gebunden. Anschließend wurden die Zellen entweder sofort geerntet oder das Medium wurde gewechselt, neue Substanz hinzugegeben und die Kulturen auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden nach 1 h mit Trypsin geerntet, um die intrazelluläre, virale DNA zu untersuchen.



**Abb. 3.3.5 Cholesterindepletion beeinträchtigt weder virale Bindung noch Aufnahme.**

PDHs wurden 1 h mit 10 mM M $\beta$ CD vorbehandelt, anschließend wurde mit 220 MGE inokuliert und die Kulturen bei 4°C 2 h inkubiert. Dann wurden sie entweder in PCR- oder Lämmli-Lysepuffer geerntet oder gewaschen und für 1 h auf 37°C erwärmt, um die virale Aufnahme zu erlauben. Diese Kulturen wurden dann nach Trypsinverdau in PCR-Lysepuffer geerntet. (A) Anschließend wurden die PCR-Lysate mit Proteinase K verdaut und eine DHBV-DNA-spezifische PCR durchgeführt. Die Amplifikate wurden auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel analysiert. (B) Die Lämmli-Lysate wurden für einen Immunblot des L-Proteins verwendet. T (mit Trypsin geerntet).

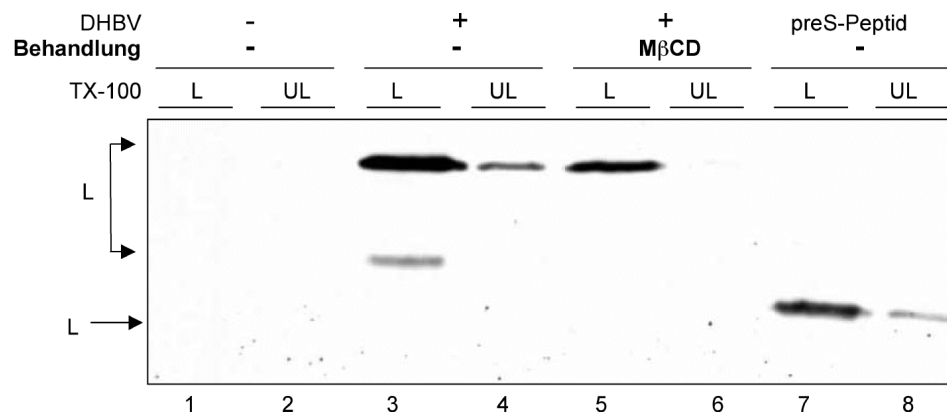
Dieser Assay zeigte, dass die Bindung der Virionen und ihre Aufnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht signifikant verändert waren (**Abb. 3.3.5**, A und B). Der inhibitorische Effekt von M $\beta$ CD kann demnach nicht auf eine stark reduzierte Bindung oder Internalisierung zurückzuführen sein.

### 3.1.3 DHBV bindet nicht primär an Detergenz-unlösliche Membrandomänen

Cholesterin per se schien gemäß oben beschriebenen Experimenten bei der Etablierung einer Infektion eine wichtige Rolle zu spielen. Das Cholesterin in *lipid rafts* ist daran vermutlich aber nicht oder nur unwesentlich beteiligt. Dies warf die Frage nach der Beteiligung anderer *lipid rafts* bei der produktiven Aufnahme von DHBV auf. Um durch *lipid rafts* aufgenommen zu werden, müssten die viralen Partikel an diese Membrandomänen binden oder nach einer initialen Bindung an andere Membranteile dorthin rekrutiert werden. Es wurde deshalb untersucht, ob DHBV an *lipid rafts* bindet oder zu diesen nach der Bindung rekrutiert wird. Zellen wurden mit M $\beta$ CD vorbehandelt und Viren oder rekombinantes preS-Peptid (AS 1 bis 165, produziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von N. Schmut und S. Urban, Universität Heidelberg) durch eine Inkubation für 2 h bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Zellmembranen in Detergenz-unlösliche und Detergenz-lösliche Membranen mit Hilfe eines Triton X-100-haltigen Puffers fraktioniert. *Lipid rafts* oder Detergenz-unlösliche Membrandomänen (*detergent-insoluble membrane domains*, DIM) sind durch ihre relative Resistenz gegenüber nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100 bei 4°C charakterisiert. Diese DIMs können deshalb nach Lyse der Zellen in einem Triton X-100-haltigen Puffer auf Eis einfach durch Zentrifugation von den löslichen Membrandomänen abgetrennt werden. Die erhaltenen Fraktionen wurden durch Immunblot-Analyse untersucht.

Das rekombinante preS-Peptid wurde dabei als Kontrolle eingesetzt. DHBV ist ein membranumhülltes Virus, dessen Membran wahrscheinlich einen relativ hohen Cholesterinanteil hat. Es bestand daher die Möglichkeit, dass auch Teile der viralen Membran Detergenz-unlöslich sind. Dies hätte in diesem Versuchsansatz, bei dem das komplette Virus an die Zelloberfläche gebunden vorliegt, dazu führen können, dass die Isolierung der *lipid rafts* nicht nur zu

einer Isolierung der zellulären, sondern auch der viralen *rafts* führte. Dies würde das Ergebnis der viralen Bindung verfälschen. Durch den Einsatz des rekombinanten preS-Peptids, das die virale Bindungsdomäne enthält und so wahrscheinlich wie das komplette virale Partikel an die Wirtszelloberfläche bindet, wurde diese Problematik vermieden.

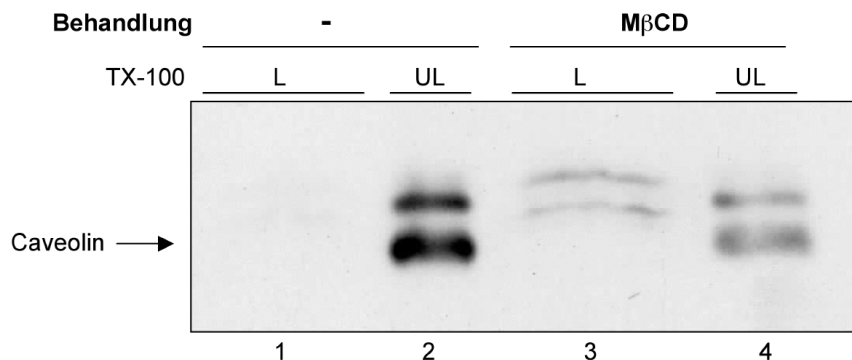


**Abb. 3.3.6 DHBV und preS-Peptid binden bevorzugt an Detergenz-lösliche Membrandomänen.**

PDHs wurden 1 h mit M $\beta$ CD vorbehandelt oder nicht behandelt. Dann wurden die Kulturen entweder mit 440 MGE DHBV oder 0,47  $\mu$ g/ml rekombinantem preS-Peptid inokuliert und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde eine Fraktionierung in Detergenz-lösliche und -unlösliche Membrandomänen durchgeführt. Die Fraktionen wurden in Lämmli-Lysepuffer aufgenommen und für einen L-Immunblot verwendet. L (Detergenz-löslich), UL (Detergenz-unlöslich), TX-100 (Triton X-100).

In sowohl behandelten als auch unbehandelten Kulturen schien das virale L-Protein in der Detergenz-löslichen Membranfraktion angereichert zu sein (**Abb. 3.3.6**, Spuren 3 bis 6). Dasselbe traf auf rekombinantes preS-Peptid zu, das als Kontrolle eingesetzt wurde (**Abb. 3.3.6**, Spuren 7 und 8). Eine der Bindung vorangehende Cholesterindepletion interferierte nicht nennenswert mit der Bindung der viralen Partikel an die Detergenz-löslichen Membrandomänen; die Bindung an die Detergenz-unlöslichen Domänen war jedoch verringert (**Abb. 3.3.6**, Spuren 5 und 6). Diese Daten wiesen darauf hin, dass virale Partikel nicht primär an DIMs und somit *lipid rafts* oder Caveolae der Zelloberfläche binden.

Um zu kontrollieren, ob die M $\beta$ CD-Behandlung die *lipid rafts* wirklich durch den Cholesterinentzug destabilisierte, wurden PDH-Kulturen für 1 h behandelt, dann lysiert und in Detergenz-lösliche und -unlösliche Membranen fraktioniert. Als Kontrolle für die Reinheit der Fraktionen wurde Caveolin durch einen Immunblot analysiert, da sich dieses Protein primär in Caveolae und damit Detergenz-unlöslichen Membranfraktionen befindet.



**Abb. 3.3.7 Cholesterindepletion führt zur Relokalisierung von Caveolin in lösliche Membranfraktionen.**

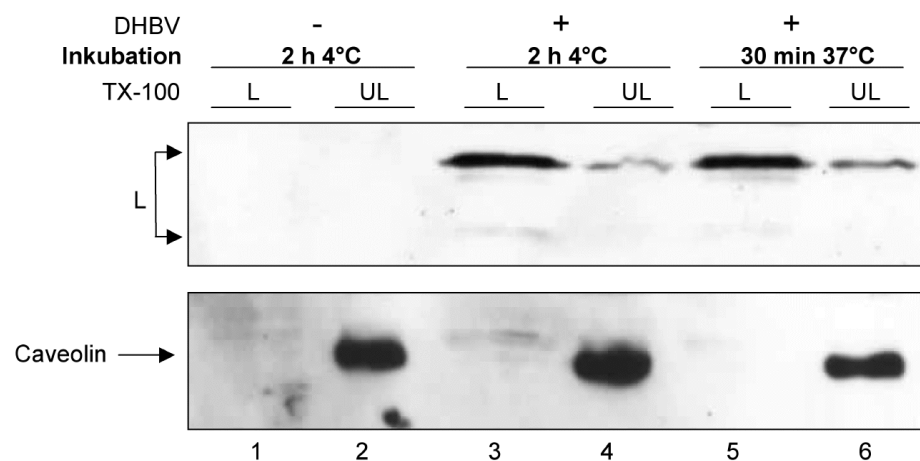
PDH-Kulturen wurden für 1 h bei 37°C mit 10 mM M $\beta$ CD behandelt. Anschließend wurden sie in Triton X-100-haltigem Puffer geerntet und auf Eis lysiert. Dann wurden die Detergenz-löslichen von den unlöslichen Membrandomänen durch Zentrifugation getrennt. Die Fraktionen wurden in Lämmli-Lysepuffer aufgenommen und darin Caveolin mit einem anti-Caveolin-Antikörper durch Immunblot nachgewiesen.

Nach Cholesterindepletion sollten die *lipid rafts* destabilisiert werden, da ihnen eine strukturgebende Komponente entzogen wurde. Dies wurde nach der Behandlung der PDHs mit M $\beta$ CD wie erwartet beobachtet (**Abb. 3.3.7**). Eine signifikante Fraktion von Caveolin befand sich nach Behandlung in Detergenz-löslichen Membrandomänen, ein Hinweis für die Destabilisierung der *lipid rafts* durch die Aktivität des M $\beta$ CD. Mit dem hier verwendeten Antikörper wurden im Immunblot zwei Caveolin-Banden sichtbar (vgl. **Abb. 3.3.8**), mit einem anderen Antikörper war nur eine Bande sichtbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass dieser Antikörper auch eine modifizierte Caveolin-Form (Phosphorylierung oder Palmitylierung) erkannte [118].

Nachdem gezeigt wurde, dass DHBV nicht primär bei 4°C an *lipid rafts* bindet, wurde untersucht, ob es in Detergenz-unlösliche Domänen transloziert,



nachdem die Zellen bei der physiologischen Temperatur von 37°C inkubiert wurden. Viren wie SV40 binden unter den oben verwendeten Bedingungen bei 4°C auch nicht primär an Detergenz-unlösliche Membrandomänen. Sie translozieren erst nach Erwärmung auf 37°C dorthin [129]. Es wurde demzufolge nicht nur die initiale Bindung der viralen Partikel nach einer Inkubation bei 4°C untersucht, sondern auch eine eventuelle Änderung der Lokalisation bei einer Erwärmung auf 37°C. Diese Temperatur sollte die Fluidität und Mobilität der Membran, die bei 4°C vermutlich stark verringert war, wieder auf ein normales, natives Niveau bringen und eine Rekrutierung in DIMs ermöglichen.



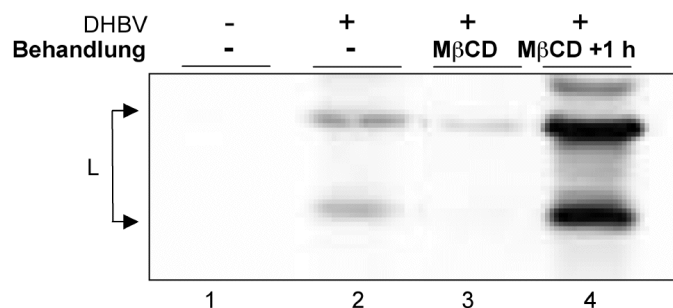
**Abb. 3.3.8 DHBV transloziert nach Erwärmung auf 37°C nicht in Detergenz-unlösliche Membrandomänen.**

PDHs wurden inokuliert und für 2 h bei 4°C zur Bindung der Viren inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen entweder geerntet oder gewaschen und für 30 min auf 37°C erwärmt. Dann wurden die Zellen geerntet und eine Fraktionierung in Detergenz-lösliche und unlösliche Membrandomänen durchgeführt. Diese Fraktionen wurden für den L und Caveolin-spezifischen Immunblot eingesetzt.

Es zeigte sich, dass auch eine Änderung der Temperatur nicht zu einer Anreicherung viraler Partikel in DIMs führte (**Abb. 3.3.8**). Dies deutete darauf hin, dass DHBV-Partikel nicht primär an DIMs binden und sich auch nach Erwärmung nicht in DIMs anreichern. Es ist demnach sehr unwahrscheinlich, dass die Cholesterindepletion die virale Infektion durch Zerstörung der DIMs inhibierte.

### 3.1.4 Cholesterindepletion von PDHs scheint die DHBV-Infektion zu verstärken

Um zwischen einem inhibitorischen Effekt der Cholesterindepletion auf die virale Membran und die Wirtszellmembran differenzieren zu können, wurden folgende Versuche durchgeführt: Zuerst wurden die Zellen für 1 h mit M $\beta$ CD vorbehandelt, dann wurde die Substanz gründlich gewaschen und die Kulturen für eine weitere Stunde inkubiert. In dieser Zeit sollte das Cholesterin an der Plasmamembran nicht wieder repletiert sein. Anschließend wurden die Zellen infiziert und nach drei Tagen die produktive Infektion untersucht.



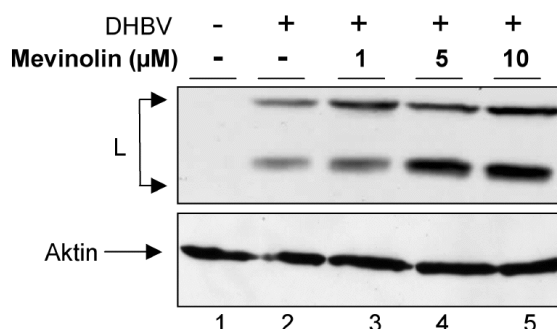
**Abb. 3.3.9 Akute Cholesterindepletion der Wirtszellen führt zur Verstärkung der Infektion.**

PDHs wurden entweder nicht behandelt oder für 1 h mit M $\beta$ CD vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen gründlich gewaschen, um die Substanz zu entfernen und die Kultur für 1 h weiter inkubiert. Alternativ wurde der Inhibitor nicht entfernt. Anschließend wurden die Zellen inokuliert, über Nacht inkubiert und nach drei Tagen für den L-Immunblot geerntet.

Es zeigte sich, dass ein inhibitorischer Effekt nur auftrat, wenn M $\beta$ CD im Medium zusammen mit den viralen Partikeln vorlag (**Abb. 3.3.9**, Spuren 2 und 3). Wurde die Substanz vor der Zugabe des Virus entfernt, war die L-Menge in den Kulturen im Vergleich zur Kontrolle sogar deutlich erhöht (**Abb. 3.3.9**, Spuren 2 und 4). Dies deutete darauf hin, dass das Cholesterin der Wirtszelle für eine produktive Infektion nicht essentiell ist und scheinbar sogar einen negativen Effekt ausübt.

Um diese Annahme zu kontrollieren, wurden Kulturen mit Mevinolin behandelt. Diese Substanz inhibiert die Cholesterinsynthese in den Zellen durch Inaktivierung des Kernenzym Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduk-

tase [175]. Die Zellen wurden für 24 h vorbehandelt, um den intrazellulären Cholesterinpool zu verringern und dann mit DHBV infiziert.



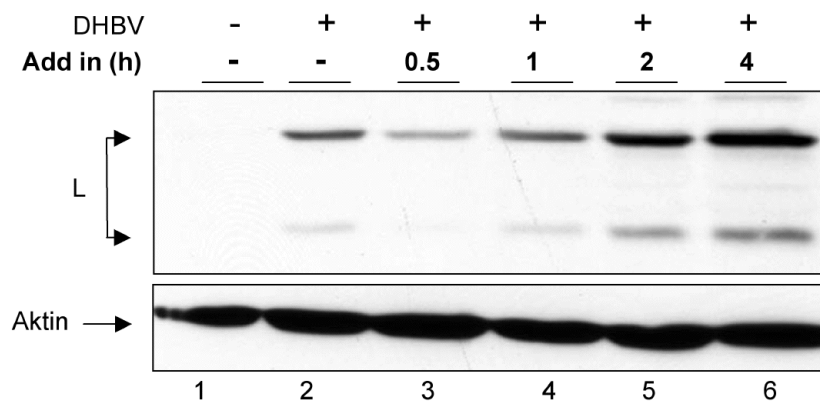
**Abb. 3.3.10 Hemmung der Cholesterinsynthese führt zu einer leichten Verstärkung der Infektionseffizienz.**

PDHs wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen Mevinolin behandelt. Anschließend wurde inokuliert, der Inhibitor aber nicht aus dem Medium entfernt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, die Kulturen für weitere drei Tage inkubiert und dann geerntet.

Drei Tage nach der Infektion zeigte sich, dass konzentrationsabhängig geringfügig mehr L-Protein in den behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vorhanden war (**Abb. 3.3.10**). Dies unterstützte die Annahme, dass das Cholesterin der Wirtszelle für die Etablierung einer produktiven DHBV-Infektion nicht essentiell ist und anscheinend sogar einen negativen Effekt ausübt.

Zusätzlich bestand die Möglichkeit, dass der intrazelluläre Transport der viralen Partikel durch eine akute Cholesterindepletion gestört wurde und deswegen keine produktive Infektion zustande kam. MßCD hat nämlich nicht nur Effekte auf die Plasmamembran von Zellen, sondern kann auch den intrazellulären Cholesterin-abhängigen Transport von Endosomen zum Golgi-Apparat blockieren [177]. Es wurde deshalb untersucht, ob eine MßCD-Behandlung nach dem Eintritt der viralen Partikel in die Wirtszelle einen Einfluss auf die Infektion hat. Virus wurde bei 4°C an die Zelloberfläche gebunden. Anschließend wurden die Kulturen gewaschen, neues Medium zugegeben und auf 37°C erwärmt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Erwärmung wurde 10 mM MßCD zugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht

wurde das Medium gewechselt und nach weiteren drei Tagen die produktive Infektion untersucht.



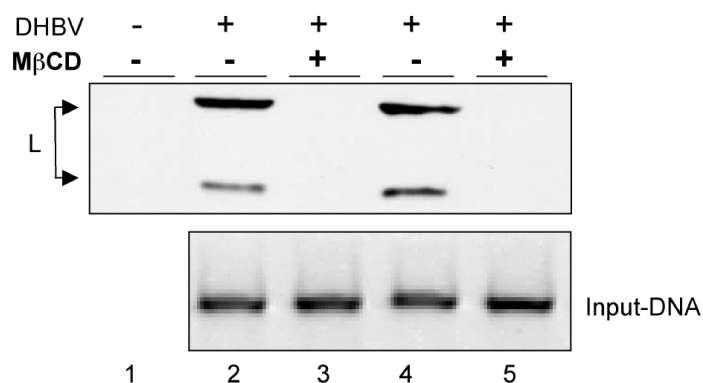
**Abb. 3.3.11 M $\beta$ CD inhibiert die DHBV-Infektion nur, wenn es zu sehr frühen Zeitpunkten zugegeben wird.**

PDHs wurden inokuliert und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen gewaschen und auf 37°C erwärmt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde M $\beta$ CD zugegeben. Die Kulturen wurden weiter über Nacht inkubiert, das Medium gewechselt und die Zellen nach drei Tagen für den Immunblot geerntet. Die Signale des Immunblots wurden mit einem Multilimager quantifiziert.

Die Infektion wurde nur dann stark inhibiert, wenn die Substanz zu einem sehr frühen Zeitpunkt (0,5 h) zugegeben wurde (**Abb. 3.3.11**, Spuren 1 bis 3). Wurde M $\beta$ CD später zugegeben, erhöhte sich die Menge an L-Protein in den Kulturen bis zu vierfach im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Abb. 3.3.11** Spuren 4 bis 6). Dies zeigt, dass die Cholesterindepletion nach der Aufnahme der Viren in die Wirtszelle keinen negativen Einfluss mehr auf die Etablierung einer Infektion hat. Nachfolgende Transportschritte konnten problemlos erfolgen. Da die viralen Partikel zu dem frühen Zeitpunkt (0,5 h nach Erwärmung auf 37°C) wahrscheinlich noch auf der Zelloberfläche waren, legte dieses Ergebnis den Schluss nahe, dass die Cholesterindepletion primär inhibierend auf die viralen Partikel wirkt.

### 3.1.5 Cholesterindepletion verändert virale Partikel irreversibel und inhibiert deren Infektiosität

M $\beta$ CD könnte, nach den obigen Experimenten zu schließen, den viralen Partikeln das für eine Infektion nötige Cholesterin entziehen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde virämisches Serum mit 10 mM M $\beta$ CD für 1 h bei 37°C behandelt. Dann wurde das Virus mit PEG gefällt, das Pellet in PBS aufgenommen und für Infektionsexperimente eingesetzt. Ein Aliquot wurde für eine DHBV-DNA-spezifische PCR genutzt, um zu zeigen, dass die Menge der Genomäquivalente, die eingesetzt wurde, vergleichbar war.

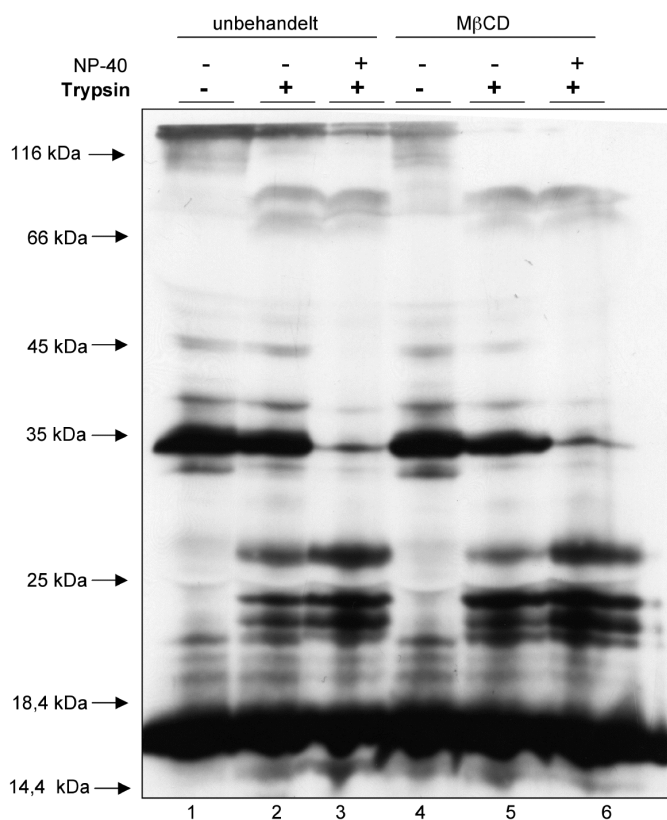


**Abb. 3.3.12 Cholesterindepletion viraler Partikel reduziert deren Infektiosität stark.**

DHBV-haltiges Serum (entsprechend 550 MGE) wurde in Medium mit 10 mM M $\beta$ CD oder H<sub>2</sub>O für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine PEG-Fällung durchgeführt. Das erhaltene Pellet wurde in PBS aufgenommen. Ein Aliquot wurde für die PCR eingesetzt, der Rest auf die PDH-Kulturen gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht wurde das Medium gewechselt und drei Tage später wurden die Zellen in Lämmli-Lysepuffer geerntet.

Die Cholesterindepletion der viralen Membran resultierte in einer stark reduzierten L-Menge in den Kulturen, die mit den behandelten Viren infiziert wurden, im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 3.3.12**). Dies deutete darauf hin, dass das M $\beta$ CD sich negativ auf die Infektiosität viraler Partikel auswirkt. Da es sich bei den vorangegangenen Versuchen gleichzeitig mit den viralen Partikeln im Zellkulturüberstand befand, konnte angenommen werden, dass auch in diesen Versuchen die Infektiosität der Viren durch die Behandlung herabgesetzt war.

Die strukturelle Integrität der viralen Membranen wird durch ein koordiniertes Wechselspiel zwischen den viralen Proteinen und Lipiden gewährleistet. Um zu überprüfen, ob die Cholesterindepletion zu einer dramatischen Veränderung in Topologie und/oder Struktur der viralen Partikel führte, wurden folgende Experimente durchgeführt. Das große Hüllprotein L besitzt eine geordnete Anordnung in der viralen Membran, die durch die Transmembrandomänen vorgegeben wird. Es diente daher hier als Indikator für Änderungen der viralen Membran. Zuerst wurde ein Trypsinverdau der behandelten Partikel durchgeführt. Aufgrund der dualen Topologie von L kann nur ca. die Hälfte der L-Proteine von der Protease angegriffen werden. Die intakte virale Membran schützt die Oberflächenproteine, bei welchen die Schnittstelle für die Protease in das Inneren des Partikels gerichtet ist, vor dem Verdau. Sollte die virale Membran diese Schutzfunktion nach der Cholesterindepletion nicht mehr ausüben, sollte mehr L verdaut werden. Dieser Verdau wurde von R. Prange und C. Lambert, Universität Mainz nach dem von C. Lambert etablierten Protokoll übernommen [54].



**Abb. 3.3.13 Cholesterindepletion verändert das Spaltmuster nach Trypsinverdau nicht.**

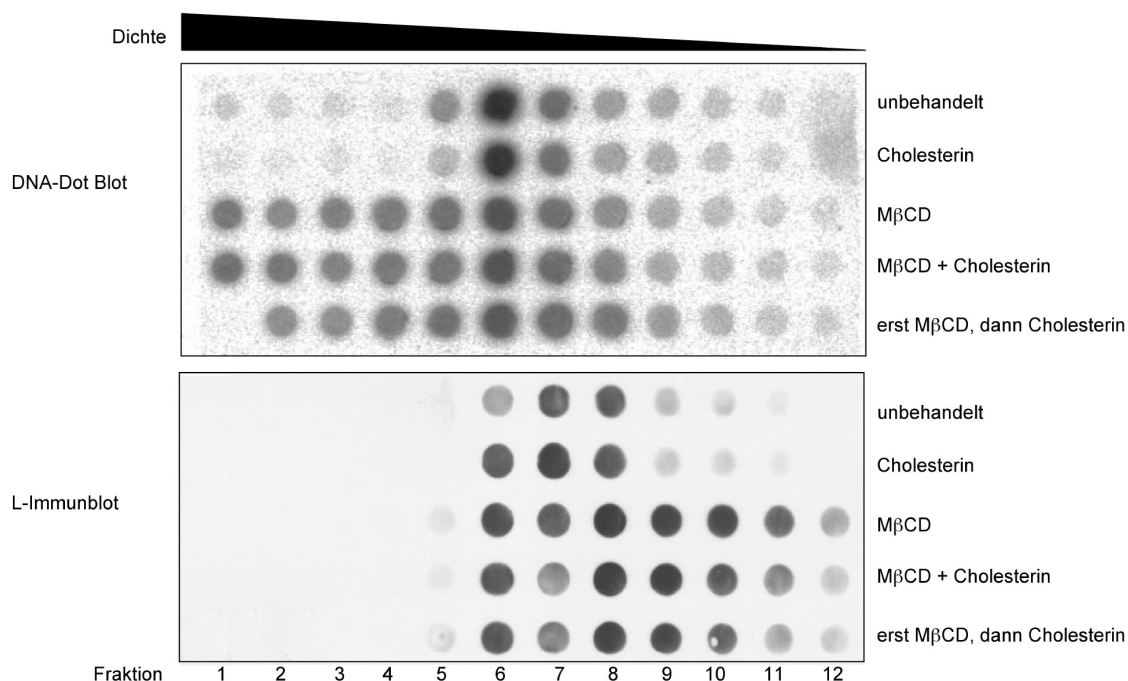
Virämisches Serum wurde wie oben beschrieben mit M $\beta$ CD behandelt und anschließend mit Trypsin inkubiert. Als Kontrolle für die Zerstörung der viralen

Membran diente das Detergenz NP-40. Die proteolytisch prozessierten Proteine wurden mit TCA gefällt und ein Immunblot mit einem L-spezifischen Antikörper durchgeführt. Abb. zur Verfügung gestellt von C. Lambert (Universität Mainz).

Nach Behandlung der viralen Partikel mit M $\beta$ CD und anschließendem Trypsinverdau ließ sich kein signifikanter Unterschied im Spaltmuster der viralen Oberflächenproteine erkennen (**Abb. 3.3.13**). Nach dem Trypsinverdau war die Menge des großen Oberflächenproteins (bei ca. 36 kDa) um etwas weniger als die Hälfte reduziert, dieses Verhältnis änderte sich nach der Cholesterindepletion nicht. Dies deutet darauf hin, dass die virale Membran durch die Cholesterindepletion nicht nennenswert geschädigt wird. Die Topologie des L-Proteins, die stark von einer intakten viralen Membran abhängig ist, ändert sich nach der Cholesterindepletion nicht.

In einem isopyknischen Cäsiumchlorid-Dichtegradienten wandern die Partikel im Gradienten bis sie die zugehörigen Dichten erreicht haben. Dabei verhalten sich die verschiedenen viralen Partikel unterschiedlich. Virionen, die das Kapsid und die virale DNA enthalten, sedimentieren in dichteren Regionen im Vergleich zu SVPs, da sie eine größere Masse besitzen. Als Konsequenz einer Cholesterindepletion sollte sich die Dichte der Partikel drastisch ändern, da sich die Masse und das Volumen ändern sollten. Diese Annahme wurde überprüft, indem das virämische Serum wie oben beschrieben behandelt und anschließend eine isopyknische Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde versucht, das entzogene Cholesterin durch eine Inkubation mit exogenem, wasserlöslichem Cholesterin wieder in die Partikel einzubringen. Dazu wurde das Serum entweder nur mit Cholesterin inkubiert oder in zwei verschiedenen Kombinationen mit M $\beta$ CD. Entweder wurde zuerst mit M $\beta$ CD für 1 h bei 37°C behandelt und anschließend für eine weitere Stunde Cholesterin zugegeben oder beide Substanzen wurden gleichzeitig für 1 h mit dem Serum inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Cäsiumchloridgradienten aufgetragen, der von 1,4 g/cm<sup>3</sup> bis 1,2 g/cm<sup>3</sup> reichte. Nach 3,5 h Zentrifugation bei 58.000 rpm in der Ultrazentrifuge wurden insgesamt 12 Fraktionen von unten nach oben abgesammelt. Diese Fraktionen wurden dann entweder auf eine Nylonmembran für einen DNA-Dot Blot oder auf eine Nitrozellulosemembran für einen Immunblot aufgebracht.

Dies erlaubte den Nachweis sowohl der DNA-haltigen kompletten Virionen im DNA-Dot Blot als auch der SVPs im L-Immunblot.



**Abb. 3.3.14 Cholesterindepletion verändert die Dichte viraler Partikel.**

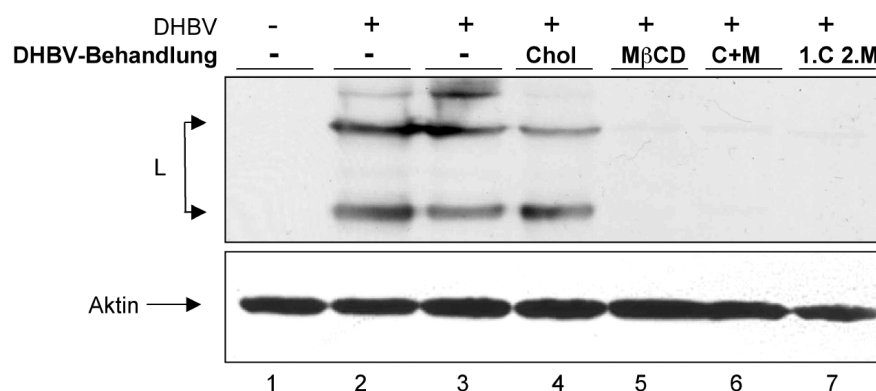
Virämisches Serum (entsprechend 550 MGE) wurde in Medium mit den angegebenen Substanzen für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das behandelte Serum durch eine Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation fraktioniert und entweder ein DNA-Dot Blot (oben) oder ein L-Immunblot (unten) durchgeführt.

In den Proben, die mit M $\beta$ CD behandelt wurden, war, im Gegensatz zu den Kontrollen, ein signifikanter Anteil DNA-haltiger Partikel in den Fraktionen mit hoher Dichte nachweisbar (**Abb. 3.3.14**, oben). Dies deutet darauf hin, dass eine M $\beta$ CD-Behandlung zu einer starken Veränderung der Dichte der Virionen führt, sie werden dichter. Dies ließ sich durch eine zusätzliche Inkubation mit Cholesterin entweder gleichzeitig oder nach M $\beta$ CD-Behandlung nicht rückgängig machen. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Immunblot, dass L nach der Behandlung vermehrt in den Fraktionen mit niedriger Dichte nachweisbar war (**Abb. 3.3.14**, unten). Auch hier war keine signifikante Änderung der Dichte nach der Cholesterinrepletion nach vorangegangener Depletion sichtbar. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Cholesterinentzug einen differentiellen Effekt auf die beiden Partikeltypen hat. DNA-haltige



Partikel scheinen nach der Depletion dichter. Dies könnte auf einen Kollaps der viralen Membran auf das Kapsid zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu wurden die SVPs, die im Immunblot nachgewiesen wurden, weniger dicht. Dies könnte auf eine Schwellung der Partikel zurückzuführen sein, die durch kleine Schädigungen der Membran entstanden sein könnte. Die Folgen der Cholesterindepletion sind irreversibel und ließen sich durch nachfolgende Inkubation mit Cholesterin nicht rückgängig machen.

Gemäß den Ergebnissen des obigen Experiments, lässt sich durch Inkubation mit Cholesterin nach der vorangegangenen Depletion der viralen Partikel deren ursprüngliche Dichte nicht wieder herstellen. Dies könnte entweder darauf zurückzuführen sein, dass eine Repletion der viralen Membran nicht möglich war oder aber, dass die bloße Inkorporierung von Cholesterin nach Depletion die ursprüngliche Struktur der Partikel nicht wieder herstellte. Es wurde dennoch untersucht, ob die mit Cholesterin inkubierten Viren nach einer M $\beta$ CD-Behandlung im Gegensatz zu den nur mit M $\beta$ CD behandelten vergleichbar oder unterschiedlich infektiös waren. Dazu wurde virämisches Serum wie oben beschrieben behandelt und anschließend die viralen Partikel mit PEG gefällt. Die Menge der im Präzipitat enthaltenen Viren wurde durch einen L-Immunblot überprüft. Sie war in allen Proben vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und eine Infektion von PDHs durchgeführt. Anschließend wurde ein L-Immunblot mit den Lysaten der inokulierten Zellen durchgeführt.



**Abb. 3.3.15 Inkubation mit Cholesterin stellt die Infektiosität cholesterindepletierter Viren nicht wieder her.**

Virämisches Serum wurde wie oben beschrieben behandelt, mit PEG gefällt und auf PDH-Kulturen gegeben. Nach drei weiteren Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet und ein L-Immunblot durchgeführt. C+M (Inkubation mit

Cholesterin und M $\beta$ CD gleichzeitig), 1.C 2.M (erst Inkubation mit M $\beta$ CD, dann mit Cholesterin).

Die mit M $\beta$ CD behandelten viralen Partikel hatten nach der Behandlung ihre Infektiosität verloren (**Abb. 3.3.15**, siehe auch **Abb. 3.3.12**). Dieser Infektiositätsverlust ließ sich durch eine Inkubation der depletierten Viren mit Cholesterin nicht aufheben. Dies lässt darauf schließen, dass die viralen Partikel nach einer Cholesterindepletion und anschließender Inkubation mit Cholesterin nicht wieder in ihren ursprünglichen Zustand versetzt werden.

### 3.2 Diskussion

Sowohl die frühen als auch die späten Schritte des viralen Lebenszyklus von DHBV hängen stark von der Interaktion von viralen und zellulären Membranen ab. Lipide dürften in der Regel hierbei eine kritische Rolle spielen, Cholesterin als strukturgebendes Lipid jedoch eine besondere. So wird die endozytische Aufnahme bestimmter Viren durch *lipid rafts* vermittelt. Diese Subdomänen der zellulären Plasmamembran werden u.a. durch die Präsenz des strukturgebenden Sterols Cholesterin charakterisiert (s. Kapitel II.2.2 und II.2.4.1). Eine funktionelle Interferenz mit der Integrität der *rafts* durch den Entzug oder die Chelatierung von Cholesterin zerstört diese *rafts* und führt zur Abortion der Infektion. In dem vorliegenden Abschnitt wurde die Rolle des Cholesterins in der Virus- und der Hepatozytenmembran für die frühen Schritte der DHBV-Infektion untersucht.

Verschiedene Substanzen zur Inaktivierung der *lipid rafts* wurden verwendet, um diesen möglichen Aufnahmeweg für DHBV zu untersuchen. Chelatierung durch Filipin III oder Nystatin, Konkurrenz durch CTB oder schwache Cholesterindepletion durch Mevinolin zur Inaktivierung der *rafts* hatten in diesen Experimenten keinen negativen Einfluss auf die DHBV-Infektion. Dies bedeutet, dass Caveolae oder *lipid rafts* wahrscheinlich bei der infektiösen Aufnahme von DHBV in Wirtszellen keine wesentliche Rolle spielen. Sie stellen höchstwahrscheinlich nicht die primäre Eintrittspforte der Hepadnaviren in die Hepatozyten dar. Dies schloss nicht aus, machte es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass eine kleine Subfraktion der Viren *lipid rafts* für die

Etablierung einer Infektion nutzt oder dass virale Partikel unproduktiv über *rafts* aufgenommen werden. Da CTB nicht mit der Infektion interferiert, kann auch ausgeschlossen werden, dass DHBV an das Gangliosid M1 bindet, um produktiv aufgenommen zu werden. CTB würde mit dieser Bindung kompetieren und so eine Infektion verhindern.

Unterstützend zu diesen Daten wurde gezeigt, dass DHBV oder rekombinantes, die preS-Region (AS 1-165) umfassendes preS-Peptid nicht primär an Detergenz-unlösliche Membrandomänen binden und auch nach einer Erwärmung auf 37°C nicht in solche Domänen rekrutiert werden. Diese Domänen enthalten eine hohe Konzentration Cholesterin verglichen mit den Detergenz-löslichen Membranen und stellen *lipid rafts* dar. Sollte DHBV durch *lipid rafts* aufgenommen werden, so sollten sich zu einem Zeitpunkt virale Marker in der Detergenz-unlöslichen Membranfraktion nachweisen lassen. Da dies zu keinem Zeitpunkt und weder bei 4°C noch bei 37°C der Fall war, kann zusammen mit obigen Daten davon ausgegangen werden, dass diese Strukturen keine Rolle bei der produktiven Aufnahme der Viren spielen. Aus den Bindungsdaten konnte außerdem geschlossen werden, dass die primäre Bindung von DHBV nicht an *lipid rafts* vermittelt wird.

Von den Substanzen, die *lipid rafts* inaktivieren, interferierte nur die MßCD mit der Etablierung einer produktiven Infektion. Diese Inhibition war sehr ausgeprägt, nach der effektiven Cholesterindepletion war im Vergleich mit unbehandelten Zellen nur 1 % der L-Menge in den Zellen nachweisbar. Dies war nicht auf eine verminderte Bindung oder Aufnahme der Viren nach Cholesterindepletion zurückzuführen. Dies bedeutet, dass Cholesterin einen essentiellen Faktor für die Etablierung einer produktiven DHBV-Infektion darstellt. Cholesterin ist jedoch Bestandteil sowohl der viralen als auch der zellulären Membranen. Um zu bestimmen, welche der beiden Membranen der Hauptangriffspunkt für das MßCD bildete, wurde das Cholesterin in nachfolgenden Versuchen mit Hilfe von Mevinolin oder MßCD nur von den Wirtszellen depletiert. Diese Versuche zeigten, dass die Inhibition durch MßCD einen negativen Effekt auf die viralen Partikel und wahrscheinlich nicht auf die Wirtszellen hat. War selektiv der zelluläre Cholesteringehalt reduziert, konnte man sogar eine Verstärkung der Infektion beobachten. Dies impliziert, dass die Effekte, die MßCD auf die Wirtszellen ausübt, sich nicht negativ, sondern sogar

positiv auf die Etablierung einer DHBV-Infektion auswirken. Dazu zählt nicht nur die Aufnahme durch *lipid rafts*, die nach den vorliegenden Daten ausgeschlossen werden kann, sondern auch andere endozytische Aufnahmewege, die durch M $\beta$ CD gestört werden [178]. Dies ist insbesondere für die Clathrin-vermittelte Endozytose zutreffend. Cholesterin scheint für die Aufrechterhaltung der Membrankurvatur verantwortlich zu sein, die zum Abschnüren der Clathrin-beschichteten Vesikel benötigt wird. Eine Verstärkung der Infektion nach der Inaktivierung dieser beiden Aufnahmewege könnte nicht nur bedeuten, dass Hepadnaviren einen alternativen Aufnahmeweg wie z.B. Clathrin-unabhängige Endozytose nutzen, sondern auch, dass einige Viren über Caveolae und Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden, dies jedoch nicht zu einer produktiven Infektion führt. Sind diese Aufnahmewege inhibiert, könnten vermehrt Viren über den produktiven Weg aufgenommen werden und so die Infektionseffizienz steigen.

Auch die durchgeführte Kinetik der Inhibition unterstützt die Aussage, dass die Cholesterindepletion auf die viralen Partikel wirkte. Die M $\beta$ CD-Behandlung war nur zu dem sehr frühen Zeitpunkt bis 0,5 h wirklich effektiv, einem Zeitpunkt, als sich die meisten Viren noch auf der Zelloberfläche befanden. Waren die Viren schon internalisiert, hatte die Depletion einen eher verstärkenden Effekt. Dies zeigte nicht nur, dass die M $\beta$ CD-Behandlung wahrscheinlich hauptsächlich auf die viralen Partikel wirkt, sondern auch, dass keine Schritte des intrazellulären Transports inhibiert sind, die das Virus bei seiner Reise im Zellinneren benötigt. Dies trifft insbesondere auf den Transport der Endosomen zum Golgi zu. Solch ein Schritt scheint demnach bei der Etablierung einer DHBV-Infektion keine oder keine große Rolle zu spielen.

Die Cholesterindepletion der viralen Partikel hatte ausgeprägte Effekte auf deren Dichte. Funktionell bedeutet dies, dass DHBV-assoziiertes Cholesterin für die Struktur und auch Infektiosität der Viren unentbehrlich ist. Die Cholesterindepletion scheint jedoch nicht die virale Membran so stark zu schädigen, dass sie für Trypsin durchlässig wurde oder sich dadurch die Topologie und Proteaseempfindlichkeit der Oberflächenproteine stark änderte.

Bei einer M $\beta$ CD-Konzentration von 10 mM wurden  $6 \times 10^{18}$  Moleküle/ml eingesetzt. Unter der Annahme, dass in 20  $\mu$ l Serum  $2 \times 10^{11}$  SVPs vorhanden sind, bedeutet dies, dass ca.  $10^7$  Moleküle M $\beta$ CD pro SVP eingesetzt wurden.

Das ist eine relativ hohe inhibitorische Konzentration. Dies deutet darauf hin, dass die viralen Partikel relativ viel Cholesterin enthalten. Leider ist die genaue Stöchiometrie der Bindung zwischen M $\beta$ CD und Cholesterin nicht bekannt; sie könnte zwischen 1:1 bis 1:1.000 liegen. Wenn man jedoch annimmt, dass die Bindung im Verhältnis 1:1 vorliegt, würde das bedeuten, dass etwa  $10^7$  Cholesterinmoleküle pro viralem Partikel entzogen werden. Unbekannt ist außerdem, ob das virale Cholesterin in *lipid rafts* oder frei zwischen den Oberflächenproteinen angeordnet ist.

Der Verlust der viralen Infektiosität nach der Cholesterindepletion könnte auf eine Kombination verschiedener Faktoren zurückzuführen sein: Inhibition der Fusion zwischen viraler und zellulärer Membran, Verlust des assoziierten Cholesterins, Verlust viraler Oberflächenproteine und Zerstörung einiger Virionen. Diese Effekte wurden für HIV-1 gezeigt. Eine Depletion der viralen Membran von Cholesterin führte zu einer starken Verminderung der Infektiosität [179]. Da die behandelten Viren bindungskompetent waren und deren Aufnahme in die Zellen nicht verhindert wurde, muss der Infektionsblock nach der viralen Aufnahme erfolgen. Darauf deutet auch das Ergebnis hin, dass der Cholesterinentzug nach Bindung der viralen Partikel an die Zelloberfläche ebenfalls zum Verlust der Infektiosität führt.

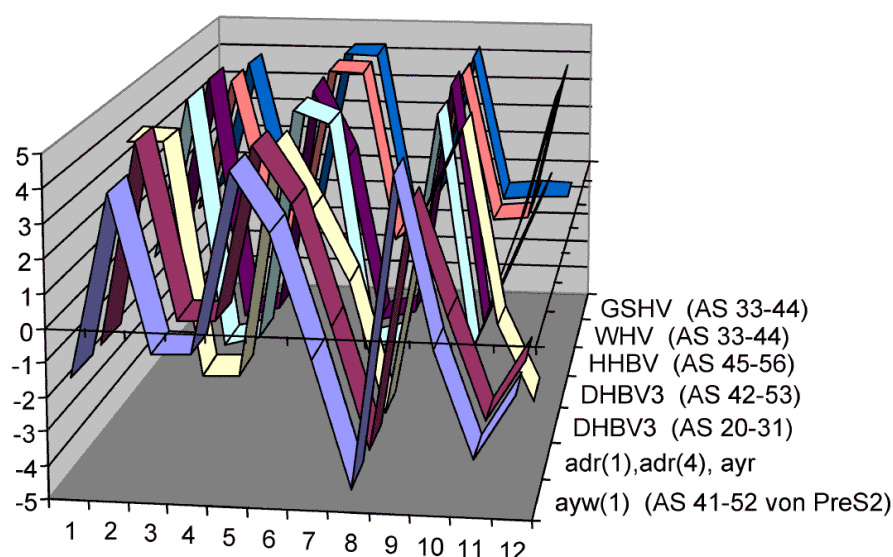
Eine Repletion des entzogenen Cholesterins mit exogenem, wasserlöslichem Cholesterin war in dieser Studie unter den verwendeten Bedingungen nicht erfolgreich. Weder die ursprüngliche Dichte noch Infektiosität des Virus konnten so wiederhergestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Cholesterindepletion mit der verwendeten Konzentration von M $\beta$ CD eine so starke Veränderung der Partikel hervorruft, dass eine Repletion nicht mehr stattfinden kann. Einige Cholesterin-depletierte Viren (z.B. HIV) scheinen aber in der Lage zu sein, entzogenes Cholesterin wieder zu ersetzen und so ihre physikalischen Eigenschaften sowie die Infektiosität wieder herzustellen [180].

In zukünftigen Studien sollte kontrolliert werden, wie viel Cholesterin den Viren durch die M $\beta$ CD-Behandlung entzogen wird und welche Auswirkungen eine partielle Cholesterindepletion hat. Dies könnte durch Markierung der Viren mit radioaktivem Cholesterin und anschließender Messung der Radioaktivität erfolgen. Die Ergebnisse sollten dann mit der produktiven Infektion korreliert

werden. Außerdem sollten elektronenmikroskopische Untersuchungen folgen, die zeigen könnten, ob die virale Hülle starke, im Mikroskop sichtbare Veränderungen durchgemacht hat. Zusätzlich könnten die Repletionsversuche mit Cholesterin oder anderen Lipiden unter anderen Bedingungen (z.B. erhöhte oder erniedrigte Cholesterinkonzentration) wiederholt und ausgeweitet werden.

#### 4. Die Rolle von Translokationsmotiven bei der Etablierung einer hepadnaviralen Infektion

In der preS-Domäne des großen Oberflächenproteins des humanen HBV wurde eine so genannte Zellpermeabilitätsdomäne (auch Translokationsmotiv, TLM genannt) identifiziert [181]. Diese Domäne entspricht einer Peptidsequenz aus 12 Aminosäuren, die eine amphipatische  $\alpha$ -Helix bilden. Proteine und Nukleinsäuren, die mit diesen TLMs fusioniert wurden, können sehr effizient in Zellen importiert werden, ohne deren Membranintegrität zu verändern [182]. Sogar der Transfer von Virus-ähnlichen Partikeln wird durch eine Fusion von rekombinantem HBcAg mit TLM ermöglicht (B. Brandenburg, persönliche Mitteilung). Eine detaillierte Analyse zeigte, dass die Fähigkeit zur Zellpermeation nicht von einer bestimmten Primärsequenz abhängig ist, sondern auf der Bildung einer  $\alpha$ -Helix beruht, in der die Aminosäuren in einer Sequenz vorkommen, die eine amphipatische Struktur zur Folge hat. Basierend auf diesen strukturellen Bedingungen wurden die preS-Domänen der L-Proteine aller bekannten Hepadnaviren auf potentielle TLMs untersucht. Im Falle von DHBV wurden dabei sogar zwei unabhängige TLMs identifiziert (**Abb. 3.4.1**).



**Abb. 3.4.1 TLMs sind in L-Proteinen verschiedener Hepadnaviren konserviert.**

Schematische Darstellung der Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren in den vorhergesagten TLMs verschiedener Ortho- und Avihepadnaviren. y-Achse: Hydropathie-Werte nach Kyte und Doolittle [183].

Positive Werte zeigen hydrophobe, negative Werte hydrophile Aminosäuren. x-Achse: 12 AS der preS-Domäne. Adr, ayr und ayw entsprechen PreS-Sequenzen von unterschiedlichen Serotypen des humanen HBV. Abb. zur Verfügung gestellt von E. Hildt (Robert-Koch-Institut, Berlin).

Die starke Konservierung der TLM-Sequenzen bei den verschiedenen Hepadnaviren deutet auf eine wichtige Rolle der TLMs im viralen Lebenszyklus hin. Da vorgeschlagen wurde, dass die Hepadnaviren durch einen endozytischen Prozess aufgenommen werden [81], wurde die Frage nach dem Mechanismus aufgeworfen, der dem Virus, dem Nukleokapsid oder dem viralen Genom den Austritt aus dem endosomalen Kompartiment ermöglicht. Dieser Austritt ist nötig, um die virale DNA freizusetzen und dem endosomalen Abbauweg zu entgehen, der das Virus inaktivieren könnte. Die putativen Translokationsmotive könnten bei dieser Freisetzung eine Rolle spielen.

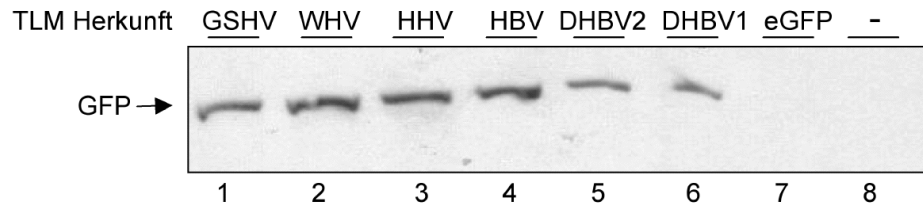
## 4.1 Ergebnisse

### 4.1.1 Die preS-Domäne des L-Proteins von Hepadnaviren enthält eine Permeabilitätsdomäne

Um zu analysieren, ob die putativen TLMs wirklich Zellpermeationseigenschaften haben, wurden am Robert-Koch-Institut in Berlin entsprechende rekombinante eGFP-Fusionsproteine generiert. Bei diesen wurde das erste DHBV-TLM (AS 20-31 des DHBV-preS), das zweite DHBV-TLM (AS 42-53 des DHBV-preS) oder die vorhergesagten Sequenzen aus Murmeltier-HBV (*woodchuck HBV*, WHV), Reiher-HBV (*heron HBV*, HHV) und Erdhörnchen-HBV (*ground squirrel HBV*, GSHV) mit eGFP fusioniert. Das HBV-TLM-GFP-Fusionsprotein diente als Positivkontrolle, nicht-fusioniertes eGFP als Negativkontrolle [181].

Um die Fähigkeit dieser Fusionsproteine zur Zellpermeation zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen für 30 min in der Gegenwart von 1  $\mu$ M der verschiedenen TLM-Fusionsproteine inkubiert. Anschließend wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt und die Zytosolfraktion durch einen GFP-Immunblot analysiert.





**Abb. 3.4.2 Die vorhergesagten TLMs funktionieren als Zellpermeabilitäts-vermittelnde Domänen.**

HepG2-Zellen wurden 30 min in der Präsenz von 1  $\mu$ M des eGFP-Fusionsproteins inkubiert. Anschließend wurden sie geerntet und eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Die zytosolische Fraktion wurde für den Anti-GFP-Immunblot genutzt. Abb. zur Verfügung gestellt von E. Hildt (RKI, Berlin).

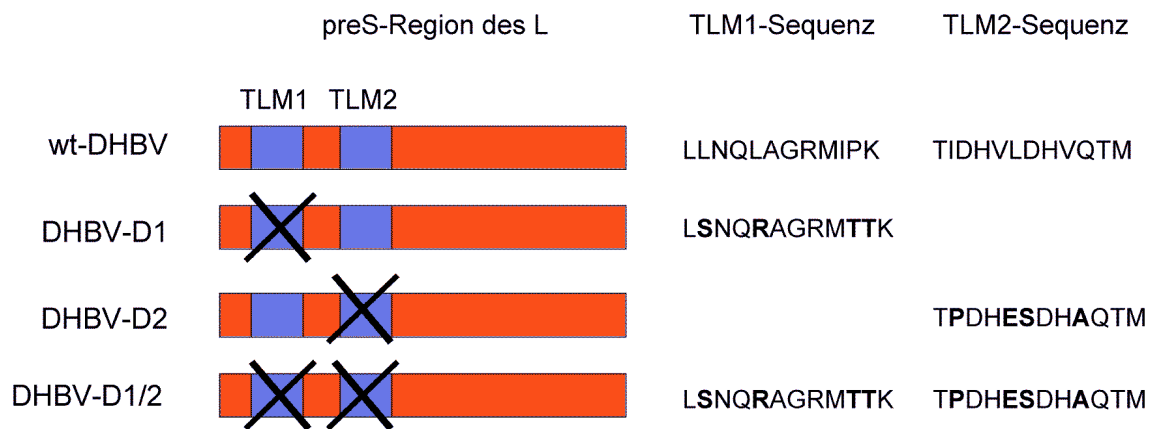
Es zeigte sich, dass die zytosolischen Fraktionen der inkubierten Zellen vergleichbare Mengen TLM-GFP-Fusionsproteine enthielten (**Abb. 3.4.2**). Wurden die Zellen nur mit eGFP inkubiert, war kein GFP-Signal im Zytosol nachweisbar.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die vorhergesagten TLM-Sequenzen in den Hüllproteinen der verschiedenen Hepadnaviren tatsächlich Zellpermeabilität vermitteln. Die Fusion von eGFP mit der TLM-Sequenz aus der entsprechenden Spezies führte dazu, dass das Protein durch die intakte Zellmembran in das Zytosol eintreten konnte. Außerdem zeigte sich, dass die TLMs keine Speziespezifität aufweisen. Obwohl sie von Viren unterschiedlicher Spezies stammten, waren sie alle in der Lage, die Translokation in humane HepG2-Zellen zu vermitteln.

#### 4.1.2 Die Funktionalität der TLM ist für die DHBV-Sekretion nicht notwendig

Um die Relevanz der TLMs für den viralen Lebenszyklus zu untersuchen, wurden im Robert-Koch-Institut in Berlin mutierte 1.2-fache DHBV-Genome generiert, die für ein L-Protein kodierten, dem das TLM1 (DHBV-D1, AS 20-31), das TLM2 (DHBV-D2, AS 42-53) oder beide TLMs fehlten (DHBV-D1/2) (**Abb. 3.4.3**). Die Mutationen führten dazu, dass die vorhergesagte Helix in ein  $\beta$ -Faltblatt umgewandelt wurde. Dies sollte zum Verlust der Membran-

permeabilität führen [181]. Dabei wurde darauf geachtet, dass der ORF der viralen Polymerase, der mit dem des L-Proteins überlappt, intakt blieb.



**Abb. 3.4.3 Schematische Darstellung des wt-DHBV-L-Proteins und der TLM-Mutanten.**

Die beiden TLMs sind blau gekennzeichnet. Im Wildtypprotein befinden sie sich zwischen AS 20 bis 31 und AS 42 bis 53. Bei den Mutanten ist jeweils entweder ein TLM oder beide mutiert.

Diese Konstrukte wurden in LMH-Zellen transfiziert, die die späten Schritte des viralen Lebenszyklus wie den Zusammenbau der Viren und deren Sekretion erlauben, und so rekombinante Viren generiert. Ab 48 h nach Transfektion wurde jeden Tag den Zellkulturüberstand gesammelt. Nach weiteren vier Tagen wurden die Zellen zur weiteren Analyse geerntet und der Zellkulturüberstand auf Anwesenheit und Menge rekombinanter Viruspartikel untersucht. Dies geschah nach PEG-Präzipitation der Partikel mit Hilfe einer isopyknischen Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation und anschließendem DNA-Dot Blot. Zusätzlich wurde durch Immunblot das virale L-Protein in den Überständen analysiert.